

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

POUR L'OBTENTION

DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DOCTORAT D'ÉTAT)

PAR

ALBERT GERMAN

Licencié ès Sciences

Pharmacien des Hôpitaux

*Assistant aux Travaux Pratiques du Certificat
d'Etudes Supérieures de Microbiologie*

1^{re} THÈSE : Contribution à l'étude de la floculation des sérums normaux et pathologiques, en présence de solutions salines.

2^e THÈSE : Recherches sur l'évolution dans les réactions de floculation, pour le diagnostic de la syphilis.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. Le doyen SARTORY, Président

CHARONNAT, Professeur

Mlle LAMBIN, chargée de Maîtrise de Conférences



CENTRE DE DOCUMENTATION UNIVERSITAIRE

TOURNIER & CONSTANS

5, Place de la Sorbonne, 5

PARIS-V^e

1951

Albert G E R M A N

Licencié-es-Sciences
Pharmacien des Hôpitaux
Assistant aux Travaux Pratiques du
Certificat d'Etudes Supérieures de Microbiologie

T H E S E S

pour l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat
(Section Pharmacie)

1ère Thèse : Contribution à l'étude de la floculation des
sérum normaux et pathologiques, en présence
de solutions salines.

2ème Thèse : Recherches sur l'évolution dans les réactions
de floculation, pour le diagnostic de la
syphilis.

Jury : MM. Le Doyen SARTORY , Président
CHARONNAT, Professeur
Melle LAMBIN, chargée de maîtrise de conférences.

A LA MEMOIRE

De mon Père et de mon Oncle

Morts pour la France
(1914-1918)

A MA MERE

Dont le sacrifice a permis mes
études; bien faible témoignage
de reconnaissance et d'affection.

A MA FEMME

En témoignage de ma profonde
affection.

A MES ENFANTS



A MON FRERE

Paul GERMAN

Docteur en Médecine
Ancien externe des Hôpitaux

MEIS ET AMICIS

En reconnaissance à tous ceux qui
m'ont témoigné quelque bienveillance
au cours de mes études.

A LA MEMOIRE DE MES MAITRES

Monsieur le Professeur J. REGNIER

Pharmacien des Hôpitaux

A qui je dois bien plus encore que
le sujet de cette thèse,
En hommage fidèle de respectueuse
reconnaissance.

Monsieur R. DAVID

Maître de Conférences à la Faculté de
Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux

Qui m'a constamment guidé dans mon
travail,
et qui, tant à la faculté qu'à
l'hôpital, a toujours été pour moi
un maître bienveillant

En témoignage de gratitude et de
respectueuse affection.

A Monsieur le Doyen A. SARTORY

Professeur de Microbiologie
Commandeur de la Légion d'Honneur

Qui a bien voulu me faire
l'honneur d'accepter la présidence
de cette thèse.

En témoignage de ma respectueuse
gratitude

A monsieur le Professeur CHARONNAT

Directeur de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux

A qui je dois d'avoir pu terminer
ce travail et qui me fait l'honneur
de faire partie du jury de
cette thèse

En hommage de ma respectueuse
reconnaissance.

A Mademoiselle S. LAMBIN

Chef des Travaux Pratiques de Microbiologie
Chargée des fonctions de Maître de Conférences

Qui me fait l'honneur de faire
partie du jury de cette thèse

En témoignage de mes sincères
remerciements et de mon respectueux
dévouement.

AVANT-PROPOS

Une importante partie des travaux de notre regretté maître J. REGNIER a eu pour but de mettre en évidence l'influence très importante exercée par l'acide salifiant certaines bases sur la pénétration de celles-ci dans les tissus et par conséquent sur leur activité pharmacodynamique.

Ces acides sont, dans la plupart des cas, les acides organiques, aryliques ou aliphatiques, renfermant ou non des fonctions alcool ou acides supplémentaires et des ramifications de la chaîne carbonée.

Ces constatations devaient conduire J. REGNIER à rechercher dans le domaine physico-chimique, l'explication des faits observés, et entre autres, à étudier le comportement des différentes albumines en présence d'anions et de cations différents.

Lorsque notre maître voulut bien nous confier un sujet de thèse, il nous proposa donc d'étudier le comportement des sérums humains, normaux ou pathologiques, lorsqu'on les traite par l'alcool ou par le formol, en présence de solutions de sels dits neutres. Sans doute l'orientation définitive de ce travail aurait-elle été différente si nous avions pu le terminer sous la direction de notre maître, puis sous celle de son élève R. DAVID. Une fatalité a voulu que tous deux nous quittent brusquement à dix mois d'intervalle. Notre travail étant bien engagé à ce moment, nous l'avons terminé en mettant plus particulièrement en expérience les anions et les cations minéraux entrant dans les innombrables réactions de floculations proposées depuis 1906, pour aider le médecin dans le diagnostic des principales affections humaines.

Ce travail devait en effet nous être facilité par notre fonction de Chef du Laboratoire Central de Chimie Biologique de l'Hôpital Bichat, où les sérums restants après l'exécution des examens prescrits, formèrent l'essentiel de notre matériel.

L'exposé de notre travail est présenté selon le plan suivant :

Dans une introduction nous rappelons les principes de chimie physique sur lesquels sont basés bon nombre de réactions de floculation.

Dans un premier chapitre nous présentons les principales réactions de floculation qui ont été proposées pour l'examen des sérums pathologiques.

Dans un deuxième chapitre nous exposons nos essais personnels :

A - La technique d'étude mise au point.

B - L'étude de la floculation par l'alcool, de sérums humains normaux ou pathologiques.

C - L'étude de la floculation par l'alcool de sérums thérapeutiques plus ou moins riches en globulines et albumines.

-) sérum antigangréneux normal
-) sérum antitétanique purifié.

D - L'étude de la floculation de sérums par le formol.

Enfin dans une conclusion générale, nous examinons les différents résultats obtenus au cours de ces essais; nous les discutons pour tenter de mettre en lumière le rôle de certains facteurs dans les réactions de floculation.

Si ce travail a pu être mené à bien, c'est d'abord grâce aux suggestions de J. REGNIER.

Travailleur acharné, d'une totale abnégation, d'un courage souriant malgré ses souffrances, notre regretté maître, après nous avoir fait l'honneur de nous compter au nombre de ses élèves, avait bien voulu nous confier un poste d'assistant aux travaux pratiques, à ce Certificat de Microbiologie qui lui tenait tant à coeur.

Nous ne pouvons plus, hélas, lui dire notre immense reconnaissance pour le paternel intérêt qu'il voulait bien nous témoigner. Nous resterons toujours fidèle à sa mémoire.

Nous nous devons d'associer à notre travail, Monsieur R. DAVID. Après nous avoir fait entrer comme moniteur aux travaux pratiques de Microbiologie voici bientôt sept ans, puis comme chef de laboratoire de l'hôpital Bichat, il nous prodigua journellement ses conseils éclairés dans la préparation du concours qui nous permit de devenir Pharmacien des Hôpitaux, et nous guida minutieusement dans l'exécution de ce travail. La rigueur, la sincérité et la conscience avec laquelle il abordait toutes ses tâches, ont été pour nous un précieux enseignement. Il ne nous est plus possible de lui exprimer toute notre gratitude et notre sincère affection.

Nous présentons à Monsieur le Doyen SARTORY le témoignage de notre respectueuse reconnaissance pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de cette thèse et nous l'assurons de notre profond dévouement.

Monsieur le Professeur CHARONNAT, directeur de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux, a bien voulu revoir notre travail et nous faire bénéficier de ses conseils éclairés. Nous lui adressons nos sincères remerciements et nous l'assurons de notre respectueuse gratitude.

Depuis notre entrée au laboratoire de Microbiologie, nous avons eu le plaisir de travailler sous la direction de Mademoiselle LAMBIN; nous lui devons notre formation bactériologique et nous sommes heureux de pouvoir lui témoigner ici toute notre gratitude pour les précieux conseils qu'elle ne cesse de nous prodiguer. Chargée de maîtrise de conférences, elle a bien voulu faire partie du jury de cette thèse. Nous lui exprimons nos remerciements et notre sincère et respectueux attachement.

Nous ne saurions oublier nos maîtres d'internat :

Monsieur le Professeur SOMMELET fut notre Pharmacien Chef pendant deux ans et demi à l'hôpital Cochin. Nous le remercions sincèrement de l'aide précieuse qu'il nous a toujours apportée dans notre vie d'interne et des utiles conseils qu'il nous a prodigués.

Ces mêmes remerciements, nous aurions voulu les adresser à Monsieur le Professeur BACH, qui fut ensuite notre maître à Cochin: un destin inexorable l'a arraché lui aussi à l'affection des siens.

Nous serions bien ingrat, si nous oublions notre maître de stage: Monsieur LEGEAY, docteur en Pharmacie, licencié-es-sciences naturelles, ancien interne des hôpitaux, dans les leçons si documentées et si claires qu'il nous faisait chaque matin, non seulement nous initia scientifiquement à l'art pharmaceutique, mais encore nous communiqua son profond amour de cette profession qu'il sut si bien représenter et défendre.

INTRODUCTION

GENERALITES sur la FLOCCULATION DES SERUMS

Le sérum, liquide qui exsude du sang après sa coagulation, est un milieu extrêmement complexe: à la fois, solution de cristalloïdes et sol de colloïdes.

CRISTALLOIDES qui sont: les uns électrolytes: Chlorure de sodium, phosphates, bicarbonates, tous plus ou moins dissociés; les autres incapables de libérer des ions en solutions: glucose à grosse molécule organique, urée, beaucoup plus petite.

COLLOIDES, surtout des protéines que l'on sépare en albumines et globulines, elles-mêmes divisées, selon le procédé utilisé, en pseudo et euglobulines (moyens chimiques) ou α, β, γ ... globulines (électrophorèse), liées d'une façon plus ou moins labile à des lipides, phosphatides, cholestérol. Ce liquide peut subir quant à sa composition des variations quantitatives ou qualitatives suivant l'état pathologique du sujet. Celles-ci se traduiront par des modifications dans l'équilibre général du milieu; les colloïdes acquerront certaines aptitudes à la floculation.

On sait que les sols colloïdaux sont des systèmes hétérogènes formés de 2 phases différentes: l'une liquide, l'autre granulaire: les micelles. La phase "MICELLE" étant en suspension dans la phase liquide.

On divise les colloïdes en 2 grands groupes:

1°) Les colloïdes suspensoïdes ou hydrophobes, instables dans lesquels la phase dispersée est solide.

2°) Les colloïdes émulsoides ou hydrophiles, stables dans lesquels la phase dispersée est "considérée comme" liquide; le granule est fortement hydraté. Les protéines font partie de ce dernier groupe. Cependant sous certaines influences que nous étudierons les micelles peuvent s'agglomérer et tendre alors à abandonner la phase liquide; l'émulsoïde devient hydrophobe, suspensoïde. Les flocons formés se rassemblent, tombent au fond du tube dans lequel l'expérience a lieu: c'est la floculation.

Le facteur le plus important de la stabilité des colloïdes semble bien être la charge électrique des granules, qui exerce entre ceux-ci des répulsions électrostatiques qui les empêchent de venir au contact les uns des autres. En effet, mis dans un champ électrique, un sol colloïdal voit ses granules se déplacer dans la même direction et s'accumuler autour d'une des

électrodes. L'examen des divers colloïdes a permis de constater que les uns se déplacent vers la cathode, porteurs de charges positives, ils sont dits colloïdes positifs.

Les autres se transportent vers l'anode, porteurs de charges négatives, ils sont dits colloïdes négatifs.

Toute opération amenant une décharge partielle ou totale des granules du sol, doit faire perdre sa stabilité à la suspension. La zone de répulsion électrostatique qui entoure les granules devenant trop petite ou nulle, les forces de cohésion deviennent suffisantes pour coller ceux-ci entre eux. Leur volume et leur poids sont alors suffisants pour les faire obéir à l'action de la pesanteur; les autres facteurs tels que viscosité, tension interfaciale, densité relative, etc... n'ont qu'une action bien moins importante. Ils agiraient surtout sur la vitesse de chute des granules déchargés.

Les colloïdes que nous étudions ici sont les protéines du sérum sanguin; ce sont des colloïdes électrolytiques ou plus exactement ampholytiques (Loeb) (80)

Par conséquent, dans la zone des pH élevés, elles se comporteront à la manière d'un acide, seront chargées d'électricité négative; par contre dans la zone des pH très bas, elles seront chargées d'électricité positive. Entre ces extrêmes il se trouvera une valeur du pH pour laquelle la protéine sera électriquement neutre: c'est le point isoionique - A cette valeur du pH, les micelles protéiques, ayant une charge électrique apparente considérée comme nulle auront donc tendance à flocculer. En réalité il existe une "bande de floculation" s'étendant aux pH immédiatement voisins, avec une intensité de floculation décroissante lorsqu'on s'éloigne du pH isoélectrique, jusqu'à une limite que l'on peut appeler potentiel critique de floculation (Vlès) et qui est le point auquel la différence de potentiel entre les particules protéiques et le solvant tombe au-dessous d'une certaine valeur.

Par conséquent, tant que le pH de la phase continue se trouvera situé à l'extérieur de la "bande de floculation" de la protéine considérée, le sol sera stable; mais dès que, pour une raison quelconque, le pH du milieu extérieur se trouvera pénétrer à l'intérieur de la bande considérée, soit que la bande de floculation se déplace ou s'étale, soit que le pH du solvant varie, il y aura apparition du phénomène décrit sous le nom de floculation, phénomène d'ailleurs progressif, d'abord opacification, puis formation de flocons enfin sédimentation du floculat. Si l'on continue de faire varier le pH du milieu, celui-ci sort à nouveau de la bande de floculation; le précipité peut retrouver une charge électrique, il se remet en suspension, le sol colloïdal est de nouveau stable.

On a donc pensé (Vlès et Coulon) (127) que les bandes de floculation de certains éléments du sérum sanguin en présence de certains réactifs ne devaient pas avoir les mêmes coordonnées pour les liquides normaux ou pathologiques. D'ailleurs de nombreux auteurs ont montré que les points isoélectriques des albumines du sérum variaient en rapport avec les symptômes morbides et généraux (Ambard et Schmidt) (3).

De ces théories purement physiques de la floculabilité des sérums, est née toute une gamme de réactions de floculation, qui devaient permettre de voir immédiatement s'il y avait maladie: réactions aspécifiques et qu'elle était cette maladie: réactions spécifiques; dans ce cas il s'agit de réaliser un système qui flocule, dans les conditions expérimentales, avec les sérums pathologiques déterminés.

Cependant il faut tenir compte du fait que le sérum sanguin est un milieu extrêmement complexe, qu'il ne s'agit pas d'un simple sol colloïdal d'une protéine pure dans l'eau mais de nombreuses protéines, plus ou moins unies à des lipides, douées de propriétés électrolytiques, et même amphioïytiques, dans une solution contenant non seulement des électrolytes, mais une quantité d'autres corps, cristalloïdes non électrolytes qui n'en ont pas moins un rôle à jouer de par leur affinité pour l'eau.

C'est le rôle des électrolytes, des sels dits neutres, de leurs anions et de leurs cations, dans le pouvoir floculant des sérums normaux et pathologiques, que nous nous proposons d'étudier. Nous essaierons également de faire ressortir le rôle de certaines substances cristalloïdes non électrolytes.

Mais avant d'exposer nos travaux nous allons rechercher dans les réactions de floculation, en les exposant succinctement, les réactifs que les auteurs ont employés et les conclusions que l'on peut en tirer.

Pour saisir parfaitement le but des auteurs des réactions que nous relatons et l'évolution de celles-ci, nous avons refait une bibliographie complète de la question en étudiant les publications originales. Nous n'avons fait appel aux ouvrages dans lesquels certaines d'entre elles étaient relatées que dans les quelques cas où nous n'avons pu nous procurer l'original.

Le point de départ de toutes ces réactions a été l'étude physicochimique de la réaction de Bordet-Wassermann.

CHAPITRE I

Lorsqu'en 1906, Wassermann, Neisser et Brück (130) appliquèrent la méthode générale de Bordet et Gengou au diagnostic sérologique de la Syphilis, ils ne doutèrent pas un seul instant que la spécificité de leur antigène ne fût due à la présence dans leur extrait aqueux de produits provenant du *Treponema Pallidum*.

Ladislas Detré (35), puis Wassermann et Plaut (132) suivis par Hans Bab (5) insistèrent sur la nécessité qu'il y avait, pour que la réaction fut positive, que les extraits aqueux employés comme antigène provinssent d'organes renfermant des tréponèmes; et Wassermann, Neisser, Brück et A. Schucht (131) précisèrent le mode de fabrication de l'antigène par extraction à l'eau phéniquée physiologique.

Cependant Levaditi et Marie (78) suivis par Michaelis (85) constatèrent dès 1907 que la présence de tréponèmes dans le foie n'était pas indispensable pour la préparation de l'antigène et que "l'anticorps" des liquides céphalo-rachidiens de syphilitiques n'était pas un véritable anticorps complet puisque non spirillicide. C'est alors que Levaditi et Yamamouchi (79) puis Wassermann (129) lui-même s'aperçurent que les substances antigéniquement actives des extraits de foie sont solubles dans l'alcool à 80°, et même que l'on peut les extraire à partir d'autres tissus que le tissu hépatique: coeur de cobaye traité par l'alcool à 95° à la température de 60° (Landsteiner, Miller et Pötzl) (73).

L'"Antigène" de la réaction de Wassermann n'était donc plus qu'une solution alcoolique de certains lipides du groupe des phosphatides, qu'une dilution dans l'eau salée isotonique, pour l'emploi transformait en une solution colloïdale; celle-ci en présence de certains "corps", certains "principes" que l'on n'osa plus appeler "sensibilisatrice syphilitique", fixerait le complément.

On étudia alors le fonctionnement intime de cette réaction, ramenée à un changement d'équilibre dans la structure physique des corps en présence.

De cette étude devaient naître les réactions de floculation

Il faut cependant noter que dès 1907 Fornet et Schereschewsky (43) avaient appliqué à la syphilis le phénomène remarqué par Nicolle, puis Bordet (15) de la floculation du système antigène + anticorps; en plaçant dans un tube du sérum de syphilitique primaire (antigène) et sans mélanger du sérum ou du liquide céphalorachidien de paralytiques généraux ou de tabétiques (anticorps), il se forme un anneau trouble à la surface

de contact. Cette réaction s'appuyait elle aussi - sur les théories de l'immunité. Mais, comme nous venons de le voir, la réaction de Wassermann semblant s'éloigner de ces théories, de nombreux auteurs cherchèrent délibérément dans des voies différentes, et puisque l'on semblait reconnaître dans la syphilis un changement dans l'équilibre physico-chimique de la partie colloïdale du sérum et en particulier de la fraction globulinique, on s'attacha à mettre en évidence cette modification en s'attaquant directement à la stabilité des colloïdes du sérum.

Certains auteurs (Vernes, Douris, Brück, etc...) étudièrent le comportement des protides sériques, en présence de réactifs variés; dans le sérum de malades atteints de syphilis, mais aussi de nombreuses autres affections. Ces travaux devaient conduire à toutes les réactions de floculation, spécifiques et surtout aspécifiques. En effet, de nombreuses réactions données par les auteurs comme spécifiques d'une maladie déterminée, furent reconnues à l'usage comme caractérisant un certain état de morbidité mais sans donner aucune indication sur la maladie en cause ou tout au plus qu'une indication très vague; de nombreuses maladies pouvant causer une "labilité" du même ordre des protéines sériques.

Nous classerons donc les réactions de floculation en 3 groupes principaux:

1°) Celles qui font appel à la floculation des colloïdes sériques par un colloïde de signe contraire.

2°) Les réactions dues à une variation dans la quantité et la qualité des électrolytes du sérum.

3°) Les réactions causées par l'addition au sérum plus ou moins dilué, de certains corps connus pour leur action dénaturante sur les protides sériques: alcool, formol, etc...

1°) FLOCULATION DES SERUMS PAR ADDITION D'UNE SUSPENSION COLLOÏDALE.

Les réactions basées sur ce phénomène bien qu'elles aient été à l'origine des autres réactions de floculation, ne rentrent pas directement dans le cadre de nos recherches. En effet, si dans la plupart des cas, les électrolytes ont un rôle à jouer dans la formation du précipité, ils n'en constituent qu'un adjuvant; le principal acteur étant la suspension colloïdale, généralement lipidique, responsable de la spécificité, aussi bien dans les réactions de la syphilis que nous étudions dans le deuxième sujet de thèse, que dans celle de la tuberculose (antigène méthylique).

Les concentrations salines assez élevées, utilisées dans ces réactions, ont généralement pour but de stabiliser le complexe formé, surtout lorsque l'on emploie des antigènes concentrés. On augmente ainsi la spécificité et la sensibilité (Sachs Witebsky, Eagle)

2°) FLOCCULATION DES SERUMS PAR LES ELECTROLYTES.-

Les protéines, étant ampholytes, donneront en présence des électrolytes, suivant qu'elles seront placées en milieu acide ou alcalin, des "sels de protides" ou des "protéinates métalliques". Lorsqu'il y a précipitation l'ion qui a neutralisé la charge du granule est entraîné avec lui et se retrouve dans le précipité.

Il sera facile de prévoir l'action des électrolytes ayant un ion prédominant; les acides agiront par leur ion H^+ et précipiteront les colloïdes négatifs, les bases, les colloïdes positifs.

L'action des sels neutres dont les ions sont comparables est plus complexe. On peut admettre (Vlès) (126) que ces ions ont un effet dépresseur sur le potentiel créé par les ions H^+ périphériques et peuvent amener ainsi le potentiel critique à venir se placer dans le pH de la solution. Ils élargiraient donc la zone de floculation et agiraient au point de vue pratique comme une variation de pH. Les particules neutralisées par un sel, et amenées par lui à charge nulle, ne sont pas forcément sur leur point isoélectrique.

a) Floculation par addition d'un acide au sérum plus ou moins dilué.

En 1917 Brück (19) étudiant les constituants de "l'Antigène" de la réaction de Wassermann, et les modifications des sérums syphilitiques mit au point plusieurs réactions de ce type:

1°) Réaction à l'acide nitrique.-

à 0 cm³ 5 de sérum on ajoute
2 cm³ d'eau distillée
0 cm³ 3 d'acide nitrique pur officinal.

On laisse en contact 10 minutes. On ajoute alors 16 cm³ d'eau et on agite.

Le précipité formé est facilement soluble dans l'eau ajoutée si le sérum est normal, difficilement et lentement s'il est celui d'un malade syphilitique.

Mais Pöhlmann (98) constate des résultats aberrants: maladie de peau ou de l'appareil génito-urinaire.

Puis Rubinstein et Mazot (107) signalent également la non spécificité de la réaction.

Gärtner (45) montre qu'elle n'est positive que pendant l'éruption mais peut le redevenir en cas d'affection surajoutée et en particulier pour toute infection qui s'accompagne d'une désagrégation de tissus et d'une augmentation des globulines plasmatiques tuberculoses, variole, adénites suppurées.

2°) Réaction à l'acide lactique.-

Brück (20) constata dans le sérum des syphilitiques la présence d'acides organiques qu'il accusa d'être la cause de la réaction de BW +

Il part d'une solution d'acide lactique à 1 pour mille, et prépare avec celle-ci des dilutions qu'il fait agir sur des sérums positifs certains. Il choisit alors la plus faible dilution qui donne un précipité net avec les sérums syphilitiques dans les conditions suivantes:

0 cm³ 2 de sérum chauffé à 56° 1/2 heure, âgé de moins de 2 jours.
+ 2 cm³ d'acide dilué.

Brück estime que la bonne dilution est: 2 cm³ d'acide lactique à 1% + 60 cm³ d'eau distillée.

Réglée de cette façon cette réaction n'est pas donnée par les sérums normaux.

Kopaczewski (67) en 1935 publiait une réaction à l'acide lactique mais toute différente de celle de Brück. Il ne s'agit plus d'une floculation de certaines protéines par un acide dilué, mais de la prise en gelée du sérum sous l'influence de l'acide lactique pur:

Sérum frais prélevé à jeun et centrifugé : 2 cm³
Acide lactique pur..... 2 cm³

On porte à l'étuve à 20° - On note le moment où l'on peut retourner le tube: le liquide s'est pris en gelée.

Un sérum normal demande 150 minutes. Les sérums pathologiques demandent beaucoup moins de temps:

Kopaczewski (68) indique pour les sérums cancéreux 4 à 15 minutes. Mais alors que R. Cappon (23) lui reconnaît une assez bonne indication, R. Gillier (51), A. Guy (56) lui refusent

toute spécificité dans le cancer. Il est de même pour Basnuevo et Sutter (7). Fabiani et Dendale (40) lui trouvent une valeur intéressante dans le Kala azar comme test de guérison.

Di Benedetto et M. Stornello (36) pensent que cette réaction serait liée à une rupture d'équilibre de la structure colloïdale sérique ce qui n'est qu'une constatation.

Enfin J. Boucek (16 bis) modifia un peu cette réaction en ce sens qu'il prend 0 cm³ 9 de sérum et 0,1 d'acide lactique racémique concentré. Il constate alors que la rapidité de la lactogélification est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps contenu dans le sérum. Ce qui rapporte cette réaction à une modification dans la quantité ou la qualité des globulines sériques.

Vernes (123) par une technique différente, a également étudié l'action de l'acide lactique; il emploie une série de tubes avec doses croissantes de réactif. Pour chaque tube il détermine la densité optique au Photomètre et trace la courbe.

Les sérums de tuberculeux précipitent plus que les autres dans toute l'étendue du graphique; cependant les différences sont trop faibles pour être utilisables.

Schmidt (110) récemment a proposé de déterminer la concentration en acide acétique qu'il faut ajouter à 1 cm³ de sérum pour obtenir l'optimum de précipitation. Il mesure également le pH correspondant à cet optimum de floculation des globulines du sérum.

Les résultats les plus faibles en acide acétique ont été obtenus avec les sérums normaux - mais il n'y a pas de relation entre un état pathologique défini et le résultat de ces examens. Ils iraient de pair avec la teneur en globulines totales mais sans parallélisme parfait.

En 1941, Meyer-Heck (84) appliqua la méthode polarographique de Waldsmidt-Leitz: Désalbumination du sérum par l'acide sulfosalicylique, après dénaturation par la chaleur.

La réaction est positive pour toutes les affections qui comportent des maladies inflammatoires.

Toutes ces réactions faisaient uniquement appel à l'addition d'un acide au sérum; plusieurs auteurs ont publié des réactions ou après addition d'acide, on ajoute une solution soit d'un sel, soit d'une substance quelconque.

La première en date, qui fut également la première de toutes ces réactions dépourvues "d'antigènes spécifiques" et qui ouvrit la voie en montrant qu'on peut réussir à régler une

réaction de ce genre pour que la précipitation du sérum normal et du sérum pathologique, par un même réactif, ne se fasse pas dans les mêmes conditions; fût la

GEL-REACTION DE MAC DONAGH (82) technique indiquée par Wollmann (136).

Il faut d'abord préparer le "sérum-acide"; pour cela on mélange : 2 cm³ d'acide acétique cristallisable
0,5 de sérum frais

D'autre part dans 4 tubes on verse :
Dans chaque 1 cm³ d'acide acétique glacial
puis respectivement 2 gouttes, 4-6 et 8 gouttes de "sérum-acide". On agite, puis ajoute dans chaque tube :
0 cm³ 2 de solution saturée de sulfate de thorium ou de lanthane dans l'acide acétique. On agite et laisse reposer.

Les sérums de malades syphilitiques donneront dans ces conditions un précipité en 1/2 heure, commençant dans le 4^e tube, qui se dépose; le liquide s'éclaircit.

Avec un sérum normal il se forme une floculation lente, le précipité ne se dépose pas, le liquide ne s'éclaircit pas.

REACTION DE BOTELHO en 1922 - Botelho indiqua une réaction qui présenterait un certain intérêt pour le sérodiagnostic du cancer. C'est une précipitation des matières albuminoïdes du sérum en milieu acide par un réactif précipitant non spécifique. La technique a été plusieurs fois modifiée. Au début on s'adressait à un acide organique (citrique, lactique).

Voici la technique d'après Wilbouchévitch (135) :

1 % de formol, on ajoute :
0 cm³ 5 de sérum dilué au 1/2 dans eau salée à 7,5 pour 1.000.

Si l'on a affaire à un sérum normal il se forme un précipité qui se redissout par agitation; il persistera pour un sérum de cancéreux. Si le liquide s'est éclairci on peut ajouter:

0 cm³ 7 d'une solution contenant 1 Gr. d'iode, 2 gr. d'iodure de potassium pour 210 cm³ d'eau.

Un précipité persistant est encore l'indice d'un cancer. Il faudrait 1 cm³ 2 de la solution iodo-iodurée pour obtenir un précipité avec un sérum normal.

Cabanis et Foulquier (21) ont repris cette réaction en remplaçant l'acide citrique formolé par l'acide lactique. L'acide lactique n'a pas besoin d'être formolé; il se conserve bien; le formol peut en effet, donner des réactions positives

à tort. Ils constatent qu'elle est souvent positive dans les cas de cancer (75 %) typhoïde... mais elle l'est aussi pour tous les sérums contenant plus de 0 gr.50 d'urée par litre.

Enfin en 1930, LE GAC (76) employant sensiblement la technique que Douris indique comme étant la meilleure (A.Z.S.2) avec la modification de Itchikawa et de Baum, signala qu'elle est positive dans 75 % des cas de lèpre :

sérum 0 cm³ 6
 ammoniacale officinale 1 goutte
 solution d'acide nitrique à 3 % dans l'eau physiologique 3 cm³
 solution iodo-iodurée de Botelho 0 cm³ 5, puis 0,5 cm³ et 0 cm³ 3 (soit 1 cm³ 3 en 3 fois) en agitant entre chaque addition.

La réaction est positive, s'il se forme un précipité persistant.

REACTION DE BENDIEN. - En 1931 Bendiem mit au point une réaction de précipitation des protides en milieu acide;

Le sérum est additionné d'acide acétique et d'une solution d'orthovanadate d'ammoniacale. Une floculation serait l'indice que le sérum expérimenté provient d'un cancéreux.

Mais F. Hogenauer et T. Gröbl (59) trouvent 50 % de réactions positives à tort.

Nielsen (93) reprit cette réaction selon la technique de Lowe qui emploie une solution d'orthovanadate de sodium $\frac{M}{10}$ à la dose de 1 cm³, qu'il ajoute à des tubes renfermant :

A - Sérum frais 0 cm³ 2
 B - Sérum inactivé 0, 2
 C - Sérum traité par l'éther 0,2

Le lendemain on examine la floculation :

Sérums normaux : floculation faible en A et C, nulle en B
 " cancéreux : floculation forte en C, assez nette en B, abondante en A.

b) FLOCULATION PAR ADDITION D'UNE SOLUTION SALINE

De nombreux auteurs ont recherché si l'addition de solutions de certains sels au sérum, ne pourrait pas permettre d'obtenir des précipitations de certaines protéines correspondant à des états pathologiques bien classés.

Vernes (1234) dans une série de tubes place 0 cm³ 2 de sérum clair et 1 cm³ 4 de solutions, de titre régulièrement croissant, de sulfate de magnésium, sulfate de cuivre, sulfate de nickel, etc... Il prend au photomètre les densités optiques des mélanges obtenus. Avec le sulfate de magnésium il ne trouve de précipitations qu'au voisinage de la saturation et sans différence avec les sérums normaux ou tuberculeux.

Les sulfates de cuivre et de zinc donnent une zone de précipitation très étendue, légèrement plus intense pour les sérums tuberculeux.

Enfin, le sulfate de nickel lui a fourni une précipitation périodique. En mettant en abscisses les concentrations en sel et en ordonnées les densités optiques lues au photomètre il obtient une sinusoïde à plusieurs périodes. Pour les sérums syphilitiques la précipitation serait plus abondante au début du tracé.

En collaboration avec Bricq et Gager, Vernes (134) a pu régler la précipitation par l'acétate de cuivre à 3,5 ou 4 % (0 cm³ 6) du sérum humain (0 cm³ 6) pour en faire une réaction sérologique, du cancer; le sérum normal ne précipitant pas dans ces conditions.

Utilisant une solution de 3.3' diamino, 4.4' dioxarséno-benzène diméthylène sulfonate de sodium (sulfarsénol) dans l'eau distillée au taux de 1 à 4 %, Caminopetros (22) publia en 1934 un sérodiagnostic de la Leischmaniose interne : à 2 cm³ de la solution de sulfarsénol il ajoute goutte à goutte le sérum du malade; il se forme d'abord un trouble lactescent avec culot floconneux qui augmente jusqu'à 7 à 20 gouttes pour disparaître si on continue d'ajouter du sérum (réversibilité de la floculation) Pour Giraud et Ciaudo cette réaction est spécifique mais peu sensible. La réversibilité est irrégulière.

REACTION DE TAKATA ARA :

Cette réaction qui se pratique sur le liquide céphalo rachidien et sur le sérum est plus compliquée en ce sens qu'elle n'a pas la même signification dans ces deux liquides, qu'elle est également dans le liquide céphalorachidien une réaction colorée et qu'enfin elle fait appel non seulement à la floculation par un sel : le chlorure mercurique mais aussi à une variation de pH par l'addition de carbonate de sodium.

Technique appliquée au sérum sanguin.

Dans 8 tubes on mesure 1 cm³ de solution de chlorure de sodium à 9 pour mille. On ajoute au premier tube 1 cm³ de sérum clair.

Après mélange on prélève 1 cm³ dans ce tube que l'on porte dans le 2°; on mélange, et ainsi de suite jusqu'au 8° tube en jetant le cm³ retiré du dernier tube. On obtient ainsi des di-

lutions en progression géométrique.

On ajoute dans chaque tube 0 cm³ 25 de solution de carbonate de soude à 10 %, puis après mélange, 0 cm³ 30 de réactif de Takata (mélange à parties égales de solution de sublimé à 0,5 % et de solution de fuchsine à 0,02 %).

Cette réaction est négative s'il n'y a pas floculation, positive si la floculation occupe au moins 3 tubes contigus, faiblement positive si 2 tubes contigus présentent une floculation nette. Dans certains tubes la coloration passe au rose violet, ce qui est surtout intéressant dans le liquide céphalo-rachidien.

La réaction est positive au cours des cirrhoses ou des insuffisances hépatiques; mais il faut des lésions profondes du parenchyme et une insuffisance fonctionnelle sévère. Elle est due à un double phénomène: perturbation quantitative des protéines du sérum (abaissement et même inversion du rapport $\frac{\text{sérum-albumine}}{\text{sérum-globuline}}$) et aussi qualitative de l'euglobuline (Hugonot et Sohler (63))

S. Pecht (103) remplace le carbonate de sodium par du carbonate acide de sodium suivi par Ucko (121) qui prend des doses fixes de sérum et des doses croissantes (0,10-0,15-0,20-0,25-0,30) de solution de carbonate acide de sodium à 0,36 %. Une réaction positive donne une précipitation rapide dans les 3 premiers tubes. La réaction positive serait due soit à une diminution du taux des protéines sériques (Hugonot, Takata, Jacobsthal, Jobe), soit à une modification qualitative: diminution du rapport $\frac{\text{albumines}}{\text{globulines}}$ (Jezzler, Rohner, Guikel, Végada,

Lazzaro, Schrender) soit à une variation du pH du sérum (Knigge, Roehrs, Kohl, Egger) soit à la présence d'acide gras (Schnidel, Kallas, Diffner).

Pour Ucko (121) Jerzy Glass (53) seule l'albumine est responsable de la réaction (la globuline de sérum à T.A. +, mélangée avec de l'albumine de sérum à T.A. - donne une réaction négative; par contre de l'albumine de sérum T.A. + mélangée à de la globuline T.A. - donne une réaction positive). En dehors d'une augmentation possible des euglobulines, les albumines perdent leur pouvoir stabilisant vis-à-vis des globulines. D'ailleurs un sérum chauffé 1 h. à 60° devient à T.A. positive; or à cette température une partie de l'albumine est dénaturée et devient précipitable avec les globulines (P. Balint et M. Balint) (6)

On a signalé des réactions de T.A. positives dans la tuberculose pulmonaire. En ce qui concerne les constituants de la réaction, Paolino (94) estime qu'il s'agit là essentiellement d'une précipitation directe de certaines protéines du sérum par le sel mercurique, les autres substances présentes n'ayant pas d'importance. La solution de chlorure mercurique est acide, la présence de carbonate bibasique, ou de carbonate monobasique, n'aurait pour but que de régler la réaction à un pH déterminé. Dans la technique originelle de Takata, le sérum, dans les premiers tubes, s'oppose déjà à la variation du pH, ce qu'il ne peut faire dans les grandes dilutions - dans la méthode de Ucko, les quantités croissantes de solution de carbonate acide jouent ce rôle.

D'ailleurs en 1922, Lesuvat et Witas (77) avaient remarqué qu'en faisant agir sur certains sérums, une solution aqueuse contenant du chlorure mercurique et du sulfate de sodium on obtenait une précipitation dans les cas de syphilis, suppurations chaudes. C'est en ce sens que Gros (55) utilise directement le liquide de Hayem de la Pharmacopée Helvétique :

chlorure mercurique	0, g.50
sulfate de sodium Codex.....	5 g.
chlorure de sodium.....	2 g.
eau distillée Q.S. pour.....	200

Dans 1 cm³ de sérum on laisse tomber en agitant, des gouttes du liquide de Hayem.

Pour un sérum normal le seuil de floculation est obtenu avec 2 cm³ 5 environ de réactif; mais le floculat se redissout par agitation - à partir de 2 cm³ 9 la floculation est irréversible. Pour les sérums d'ictériques, négatifs à la réaction de Takata le seuil de floculation se place entre 0,58 et 1 cm³ 40. Pour ceux qui sont positifs à la réaction de Takata il suffit de 1 à 10 gouttes (0 cm³ 03 à 0 cm³ 3) Cette réaction est donc beaucoup plus sensible que celle de Takata.

L'addition de solution saline ne suffit pas toujours pour obtenir un précipité dans le sérum, suivant les sels employés, les concentrations salines utilisées, il est souvent nécessaire, pour rendre visible le changement produit par la présence d'électrolytes dans le milieu, de faire appel à un autre facteur et en particulier à l'action de la chaleur.

Kürten, en 1939, soumettant un sérum non dilué à l'action de la chaleur à 100°, a remarqué que celui-ci peut se coaguler de 2 façons:

type I :	flocons fins
type II :	bouchon gélatineux compact

Le type II serait caractéristique des cancers.

Ces résultats furent infirmés en 1941 par Werten et par Zünke. CH.Marquardt (83) reprenant cette réaction a bien retrouvé quelque différence mais pas assez tranchée pour que celle-ci ait une valeur de diagnostic. Elle pourrait servir à confirmer une syphilis secondaire.

Wegievko (133) en 1924 utilisait déjà l'action de la chaleur en présence d'électrolytes pour différencier les sujets normaux, des sujets atteints de tuberculose pulmonaire avancée, pneumonie, rhumatisme, néphrose. Pour cela on recueille :

0 cm³ 2 de sang par piqure au doigt dans
0 cm³ 4 de solution de citrate de sodium à 2 %

après sédimentation des hématies, on répartit le liquide clair surnageant dans 4 tubes; et on ajoute une solution de Cl Na

Plasma dilué	0,2	0,1	0,05	0,05
solution de				
chlorure de Na	0	0,1	0,1	0,15

(Cette solution peut être supposée isotonique car le titre n'en est pas indiqué) et les tubes sont portés au B.M. à 52° - Il peut se former des flocons; si non on reporte 3 minutes à 54°. Cette réaction est négative chez les sujets normaux.

Bien que s'adressant au plasma et non au sérum. Wegievko assure que la réaction ne dépend pas du fibrinogène, mais uniquement du quotient albumines, et du degré de dispersion des moé-
globulines
cules d'albumine.

Weltmann en 1930 avait signalé que le sérum fortement dilué ne se coagulait par chauffage qu'à condition d'y ajouter une certaine quantité d'électrolytes; la quantité nécessaire variant lorsque le sérum est pathologique.

Il faut moins d'électrolytes lorsqu'il s'agit d'un processus fibreux, d'une lésion parenchymateuse hépatique, d'un processus hémolytique. Il faut plus d'électrolytes lorsqu'il s'agit d'une inflammation, d'une nécrose, ou d'une néphrose.

Technique de la réaction de Weltmann, In Teufl (117)

Préparation de la solution mère de chlorure de calcium.
Dissoudre 99,14 grammes de chlorure de calcium cristallisé dans 1.000 cc. d'eau distillée, redistillée, stérile.

Préparation de la solution à utiliser (bonne conservation)

Flacons de 100 cc. numérotés :	1	2	3	4	5	6	7	7,5	8	9	10
Solution mère en cc.	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,55	0,3	0,2	0,1
H ₂ O dis. redist., stérile							q.s.p.	100 cc. partout			

Réaction proprement dite :

Tubes propres de 15 cc. :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5 cc. du flacon N°	1	2	3	4	5	6	7	7,5	8	9	10
Sérum pur non hémolysé :							0,1 cc partout				

Boucher avec le ponce, mélanger 3 fois, mettre au bain-marie bouillant pendant 15 minutes.

Coagulation normale: + + + + + + + 0 0 0 0

Processus inflammatoire, nécrose
néphrose, p.ex: + + + 0 0 0 0 0 0 0 0

(déviati on vers la gauche)

Processus fibreux, hépatite,
hémolyse

p. ex : + + + + + + + + + 0
(déviati on vers la droite.

Deux exemples d'application clinique: dans l'infarctus le résultat de la réaction de Weltmann serait plus précoce que le résultat de l'électrocardiographie: on observe une nette déviati on vers la gauche.

Dans le ramollissement cérébral, il y a déviati on à gauche alors que, dans l'hémorragie cérébrale, la coagulation est normale ou présente une déviati on vers la droite.

Dans la cirrhose de Laënnec, il y a toujours déviati on vers la droite.

Dans le diagnostic différentiel entre abcès du cerveau latent ou séquelle cicatricielle la réaction de Weltmann donne les résultats suivants:

Abcès latent: déviati on vers la gauche.

Séquelle cicatricielle: déviati on vers la droite ou coagulation normale. Selon l'auteur, il n'y aurait pas un seul chapitre de la pathologie ou la réaction ne puisse donner des renseignements utiles. Ces résultats ne présentent aucun parallélisme avec la sédimentation sanguine ou le nombre de leucocytes. Cette réaction nécessite un nombre important de tubes.

Technique simplifiée de Teufl d'après Müller (89)

Mettre dans un tube propre 0,1 cc. de sérum ainsi que 4,9 cc. d'eau distillée. Secouer. Ajouter 2 gouttes strictement normales d'une solution à 0,5% de chlorure de calcium. Secouer. Chauffer

jusqu'à ébullition très courte. Si aucun trouble n'apparaît, recommencer en ajoutant chaque fois 2 gouttes de chlorure de calcium et en chauffant jusqu'à apparition d'un trouble, puis de flocons, et finalement d'une sédimentation. Noter alors le nombre de gouttes de chlorure de calcium employées. Normalement, on obtient la sédimentation avec 8 gouttes. Il y a "déviation vers la gauche" lorsqu'on a obtenu la sédimentation avec 18 gouttes p. exemple. Il y a "déviation vers la droite" lorsqu'on a obtenu la sédimentation à 4 gouttes p. exemple.

Dans la syphilis il y aurait déplacement à droite dans 77% des syphilis récentes et dans 97% syphilis anciennes (Sicher et Wiedmann) (112).

Kretz et Kudlec (69) expliquent la réaction de Weltmann par des changements quantitatifs et qualitatifs dans la constitution du sérum.

Mais Sidney Auerbach (4) constatant que le liquide d'ascite des cirrhotiques coagule au-delà du 7^e tube comme leur sérum, malgré leur différence de teneur en protéines diverses estime que cette réaction dépend de changements qualitatifs dans les protéines du malade et non quantitatifs. C'est également l'opinion de Hellfried Rosegger (105).

Le déplacement à droite qui correspond à une augmentation du pouvoir de coagulation, est associé à la prolifération abondante du tissu conjonctif (Weigtländer) (128)

Enfin en 1945, Kuhne (71) fait connaître la modification de Knückel et Kemon, qui emploient un seul tube comme Teufl. Cette méthode serait plus sensible que la méthode originale.

Reprise récemment en France par Bertrand, Guillaume et Quivy (9). Cette réaction de W. leur permettrait de distinguer les tumeurs cérébrales malignes, des processus bénins.

C) FLOCCULATION PAR DIMINUTION DE LA CONCENTRATION EN ELECTROLYTE

Dès 1908 Klausner (65) partant de l'hypothèse que le sérum des syphilitiques donne la réaction de Bordet-Wassermann grâce à sa richesse en globulines, utilise la propriété de celles-ci d'être insolubles dans l'eau pure, pour les mettre en évidence.

Dans un tube à essais étroit on mélange:

Sérum clair	0 cm ³ 2
Eau distillée	0, cm ³ 7

La formation d'un précipité de 3 à 4 mm au bout de 15 heures indique que le sérum provient d'un syphilitique. Les sérums témoins ne donnent ce précipité qu'après plus de 24 heures.

Cependant la réaction serait donnée également par des sérums de malades atteints de Lupus, typhoïde, pneumonie. Revenant sur sa réaction, Klausner (66) pensa qu'elle serait due à la présence de lipoides dans le sérum. En effet, un sérum normal additionné de lipoides précipite par dilution aqueuse.

Cette réaction très importante au moment de sa parution, car elle orienta les chercheurs dans une voie nouvelle pour le diagnostic de la Syphilis, fut vite dépassée.

Elle a été reprise et modifiée par Chorine en 1934 (27). Le sérum, provenant d'un sang conservé 24 h. en glacière, est séparé, centrifugé si besoin.

Dans un tube on mélange: sérum clair frais 0 cm³ 2
eau distillée 1 cm³ 8

Ce qui nous donne une dilution au 1/10. On verse le mélange dans la cuve du Photomètre V.S.Y. et on fait immédiatement la lecture. On reverse dans le tube que l'on bouche au liège et place à l'étuve à 37° pendant 3 heures, puis à la température du laboratoire pendant 20 minutes. On fait alors une 2° lecture. On soustrait le 1er chiffre du 2° et on obtient la valeur de la floculation en degrés Vernes.

De 7 à 11 sérums normaux
de 11 à 40 douteux mais surtout syphilitiques ou tuberculeux
de 40 à 80 sérums de paludéens
au-dessus de 100 : présomption de kala-azar

Le Bourdellès et Mauvais (74) ont légèrement modifié la technique. On prend 2 tubes A et A'

tube A : 0 cm³ 2 de sérum + 1 cm³ 8 d'eau distillée
tube A' : 0 cm³ 2 de sérum + 1,8 d'eau salée à 9 o/oo

On laisse 30 minutes à l'étuve à 37° et on fait la lecture photométrique de l'opacité de A et de A'

Le degré de floculation s'obtient en retranchant A' de A. Pour Chorine (8) la stabilité du sérum dans l'eau distillée ne dépend pas de la quantité absolue des euglobulines, mais de leurs proportions par rapport aux protéides totaux. Il n'y a précipitation à cette dilution de 1/9 que si leur taux dépasse 52% des protéides totaux. Les albumines exercent une action stabilisante dont l'intensité dépend: du pH du sérum, de la dilution du sérum, de la quantité de sels minéraux.

Prudhomme (100) insiste sur l'état de conservation du sérum; en effet la floculation diminue avec le temps de conservation du sérum, ce qui serait dû au départ de CO₂. Le chauffage à 55° 30 minutes inhibe la floculation par départ de CO₂, le sérum passe de pH 8 à pH 8,6.

La réaction de HENRY (58) pour le diagnostic de l'infection palustre, a connu des fortunes diverses. Nous la plaçons ici, car elle emploie une solution de ClNa à 1 pour 750, donc largement hypotonique, et d'autre part, pour plusieurs auteurs, cette réaction présenterait les caractères de la floculation par l'eau distillée.

(Voir technique détaillée in Demanche Précis de Serodiagnostic) (34)

De la Mélanine (pigment noir de la chorofde de l'oeil de boeuf) est diluée dans de l'eau salée à 1 pour 750.

Dans 2 tubes on place:	Réaction	Témoin
Mélanine diluée	1 cm ³	1 cm ³
Sérum frais, clair	0,25	
Sérum chauffé		0,25

On agite, porte à l'étuve à 37° pendant 1 h. et demie, puis 20 minutes à la température du laboratoire. On lit au photomètre les densités optiques des 2 tubes. On retranche le second du premier.

0 à 12 :	réaction négative
12 à 20 :	" suspecte
20 à 50 :	" positive

Pour Henry (58) la Mélanine est bien un antigène spécifique qui se combine à l'anticorps formé par la présence de pigment mélanique dans le sang des Paludéens. Cependant il y a de grosses différences entre ces 2 pigments. Aussi pour Chorine et Koechlin (29) la mélanine introduite ne serait que "l'indicateur d'une floculation" du type de celle obtenue dans l'eau distillée.

Cependant Trenz (118) extrayant les euglobulines des sérums normaux et paludéens a pu montrer, dans la floculation de Henry:

1°) avec les euglobulines de sérum normal la réaction a les caractères d'une surfloculation en eau distillée.

2°) Avec les euglobulines de paludéens il y a floculation proprement dite. D'ailleurs l'intensité des floculations et surfloculations varie avec l'adjonction de sels et même certains sels agissent en sens inverse sur les 2 phénomènes (119).

L'instabilité des globulines est une condition indispensable pour que la Mélanine puisse se fixer sur l'euglobuline et déterminer la mélanoréaction. L'eau distillée précipite en plus des éléments caractéristiques des fractions lipodiques et protéiques qui n'ont aucun rapport avec la mélanofloculation (120).

En tous cas pour Le Bourdellès et Liegeois (74) la réaction de Henry, pour le diagnostic de l'infection palustre, est franche, nette et assez fidèle.

3°) Floculation par addition de substances dénaturantes

Dans ce chapitre nous rangeons la floculation obtenue par addition d'alcool, d'acétone, formol...

L'adjonction de solvants organiques à des sérums modifie la constante diélectrique du milieu et la dissociation des groupements polaires des protéines. De ce fait leur solubilité est différente. Mais à température normale il y a dénaturation des protéides recueillis (Grabar) (54)

à pH 5,5 avec l'alcool à 20-25% de concentration finale (à 5°) le précipité formé est surtout des γ globulines - entre 30 et 40%, il est formé surtout par des β et α globulines (Cohn) (31)

D'après Kruyt (70) les colloïdes stables fixent une quantité considérable d'eau. En diminuant cette hydratation on change complètement le caractère du sol et on le transforme en un sol ayant les propriétés des sols hydrophobes instables. Si l'on additionne d'alcool en quantité suffisante il y a déshydratation des particules et la floculation peut se produire sous l'influence de facteurs qui sont normalement insuffisants pour cela.

Loeb (80) dans ses recherches restées classiques sur les protéines définit un "nombre d'alcool" ou "indice d'alcool" le nombre de centimètres cubes d'alcool absolu qu'il faut ajouter à 5 cm³ d'un sol pour en produire la floculation. Vernes dans ses recherches sur la précipitation du sérum humain, normal ou pathologique, a étudié l'action de l'alcool de titre de plus en plus élevé sur le sérum (0 cm³ 6 de sérum pour 0 cm³ 6 d'alcool plus ou moins dilué). Il constata évidemment que le précipité croît avec la concentration de l'alcool, mais aussi que la courbe obtenue en portant en abscisses les concentrations en alcool et en ordonnées les densités optiques du mélange, est décalée pour les sérums tuberculeux dont la précipitation est plus intense. Il signala également que les sérums non chauffés précipitent davantage avec l'alcool que les sérums chauffés, dans les mêmes conditions. Brück (19) en 1917 s'est servi de l'alcool pour un séro-diagnostic et la syphilis:

On prépare les solutions a:	alcool à 96°	100 cm ³
	eau distillée	200 cm ³
b:	alcool à 96°	80 cm ³
	eau distillée	220 cm ³

L'eau et l'alcool utilisés doivent être neutres: à 3 cm³ de chaque solution on ajoute 0 cm³ 2 de sérum chauffé à 56° pendant 1/2 heure. On note le trouble en 10 minutes et en 1 heure. La température doit être maintenue égale ou inférieure à 15°. En cas de syphilis il se produit un trouble en quelques minutes dans les 2 tubes.

En 1925, appelant Illikibiologie, l'étude des phénomènes qui marquent le vieillissement progressif des organismes (qui est d'ailleurs indépendant de l'âge) Parhon et Kahane (96) étudièrent la floculation des sérums par l'alcool; ils fondèrent cette réaction sur le fait que le cholestérol sanguin croît avec l'âge et plus le sang est riche en cholestérol, moins grande est la quantité d'alcool à introduire pour obtenir l'opalescence. Celle-ci croît d'intensité avec l'âge: elle est très forte après 40 ans.

Le rôle du cholestérol et de l'âge dans la précipitation par l'alcool n'a pas été retenu par Schwenkenbecher (111). Pour cet auteur cette opacification dépend de 3 facteurs: la concentration en alcool, la teneur du sérum en protéines, et la composition de ces protides.

Utilisant une méthode due à Keller, qui semble bien n'être qu'une modification de celle de Vernes, il établit des courbes de l'opacité en fonction de la concentration en alcool. Pour les sérums de tuberculeux le maximum d'opacité se déplace vers les faibles concentrations en alcool, les courbes s'aplatissent (le traitement par le thiosulfate de calcium ramènerait les courbes vers la normale).

Waldschmidt-Leitz et Mayer ont essayé de différencier les maladies inflammatoires, des tumeurs, en combinant la précipitation par l'acide sulfosalicylique (voir plus haut) avec la précipitation par l'alcool à 66% qui ne précipiterait que la substance spécifique du cancer (cité par Meyer-Heck) (84)

Ayant constaté que le sérum pathologique précipite plus facilement par l'alcool, le phénol, le sublimé, la chaleur, Daranyi (35) combina l'action de l'alcool et de la chaleur en présence d'une solution saline:

Alcool à dilution croissante
Solution de chlorure de sodium à 2%
Chauffage 20 minutes à 60°

D'après Straszyński (115) cette réaction est positive dans la tuberculose, les tumeurs, la syphilis primaire et secondaire, chez les femmes enceintes. Elle expliquerait la sensibilité plus marquée de procédés au sérum frais dans la floculation des sérums syphilitiques par un double phénomène:

- 1°) Spécifique de la syphilis (lipoides)
- 2°) Manifestation de la labilité des globulines

C'est également l'avis de Renaux et Petrovanu (104) M. Honda et S. Yanagi (60) ont comparé dans 160 cas, la réaction de labilité de Daranyi avec la vitesse de sédimentation des hématies

Ils ont constaté que les plus fortes dilutions pour lesquelles la réaction se produit entre 1 h. et 2 h., considérées comme normales sont pour l'homme 3 à 3,5. Pour la femme 3,6 à 3,9; au moment des règles 4 à 4,8.

Simon (113) a étudié l'action de l'alcool et de l'acétone sur les sérums - ses conclusions sont du même ordre.

Le chloroforme ajouté au sérum fait naître un trouble que Knuckel évalue au photomètre.

Hanlrich (57) a repris cette réaction: les sérums normaux donnent un degré photométrique de 1 à 15 - Au-dessus de 15 on peut affirmer l'origine pathologique du sérum en particulier: tuberculose et maladies infectieuses en général, cancer de l'utérus. Cependant dans la tuberculose fibreuse on trouverait seulement de 8 à 16.

Comme l'avait remarqué Daranyi le phénol a une action précipitante sur les protéines (le "phénol aqueux" à 95% de phénol a, au contraire une action dissolvante sur les protéines, utilisés par exemple dans la purification des pyrogènes).

Vernes avec Bricq et Gager (125) étudia l'action de solutions aqueuses de différents phénols sur le sérum humain normal ou pathologique: phénol, résorcine, phloroglucine. Après avoir constaté que les sérums tuberculeux et de porteurs de chancres flocculaient dans certaines conditions avec ces réactifs, il fit choix de la solution de résorcine avec la technique suivante:

Dans un tube on introduit:

Sérum frais et clair.....	0 cm ³ 6
Solution de résorcine pure à 1,25 dans l'eau distillée.....	0 cm ³ 6

On mélange, transvase dans la cuve du photomètre (sans faire de bulles) et mesure la densité optique. On vide dans le tube, bouche au caoutchouc et conserve 4 heures à la température du laboratoire. A ce moment on agite légèrement le tube, transvase de nouveau dans la cuve et mesure la densité optique. De ce chiffre on déduit le premier - De 0 à 15 : sujet non tuberculeux
de 15 à 30 : doute
au-dessus de 30 : tuberculose en évolution.

Cause d'erreur: dans le chancre au début on peut obtenir une flocculation à 70, mais elle est éphémère; alors qu'elle persiste dans la tuberculose.

Dangeron et D'Hour (72) ont trouvé un chiffre élevé chez certains syphilitiques et rhumatisants non tuberculeux. Prunell (101) a trouvé également un chiffre supérieur à 30 chez 79% des

malades atteints de typhoïde et non tuberculeux. Si l'on ajoute des sels dans le mélange sérum-résorcine, la floculation est atténuée. L'augmentation du taux salé amène une dissolution du précipité, qui est plus forte pour les sérums de tuberculeux et proportionnelle à la quantité de sel Vernes (123) et aussi Andrée Boutaric (18)

Paul Bordet (16) a montré l'étroite parenté entre la réaction à la résorcine, la réaction de sédimentation et la lactogélification. De plus il a mis en évidence que l'injection de filtrats de culture de certains microbes (pyocyanique, coli) renforce considérablement l'aptitude du sérum à floculer par la résorcine. Or nous savons que ces filtrats déterminent un choc pyrogénique avec fonte leucocytaire et augmentation passagère des globulines (A. German) (49).

Chorine et Prudhomme (30) ont observé que l'addition de sérum-albumine au sérum des tuberculeux, diminue son pouvoir de floculer par la résorcine et que d'autre part le sérum des non tuberculeux devient plus floculable lorsqu'on l'additionne de l'euglobuline qui s'insolubilise lorsque la teneur en sel s'abaisse au-dessous de 4 pour 1.000.

REACTION DE MACLAGAN

En 1944 MacLagan fit connaître une réaction de floculation qui utilise également une solution aqueuse d'un phénol ; il a fait choix du thymol en solution aqueuse tamponnée par du Véronal sodique à pH 7,8. Mateer en 1947 a augmenté la sensibilité de la réaction en abaissant légèrement le pH à 7,55. Il a ajouté de plus une lecture par clarification.

La solution de thymol transformée se prépare de la façon suivante.

Eau distillée, 500 cm³
Véronal, 1 gr. 38
Véronal sodique, 1 gr. 03
Thymol, 3 gr.

Porter à l'ébullition, en agitant fortement, et laisser revenir à la température du Laboratoire. Ajouter alors quelques cristaux de thymol, agiter, laisser reposer 12 heures à 20-25°.

Après une dernière agitation, filtrer et ajuster à pH 7,55. La solution est de bonne conservation si on la maintient à 20°.

Réaction :

Dans un tube à hémolyse on mesure dans l'ordre.

Sérum clair, 0,05
Réactif au thymol, 3 cm³

Après une demi-heure, on compare le trouble obtenu à une gamme. En principe on doit utiliser la gamme de Kingsbury destinée au dosage néphélométrique de l'albumine. L'unité Maclagan est le trouble équivalent à l'étalon 0, gr.10 pour 1.000 d'albumine de cette gamme. Le trouble équivalent à 0 gr.60 pour mille d'albumine est égal à 6 unités Maclagan.

En France où l'on utilise généralement la gamme d'albumine de Mestrezat, il faut tenir compte que les dilutions des réactifs ne sont pas les mêmes. Vincent et Lagreu ont donné une équivalence de ces deux gammes.

(La gamme de Mestrezat étant obtenue en portant 5 minutes au B.M. bouillant un volume de la solution albumineuse additionné d'un dixième de solution d'acide trichloracétique à 30 %.)

L'opacité du tube contenant la solution d'albumine à 0,10 pour 1.000 de la gamme de Mestrezat, correspond à 3,6 unités Maclagan (le tube 0,20 à 7,2 etc..., etc...)

Les auteurs indiquent également les équivalences pour les lectures photométriques.

Une Unité Maclagan = 8° Vernes = environ 20° à l'électrophotomètre Meunier (écran jaune 57, diaphragme 10, (cuve de 1 cm).

En employant la technique de Mateer on peut effectuer une lecture par clarification après 18 heures de séjour à l'obscurité. On exprime les résultats comme la réaction de Meinicke, (+, + +; etc.).

Résultats : Les sérums normaux donnent une opacité de 0 à 3 unités Maclagan, les sérums pathologiques de 3 à 12 (Hépatite ictérique).

ACTION DU FORMOL SUR LES SERUMS

En 1920, Gaté et Papacostas (46) publièrent "une nouvelle réaction des sérums syphilitiques":

Sérum clair 1 cm³
Formol officinal 2 gouttes

Laisser 24 à 36 heures à la température du laboratoire. Un sérum normal restera liquide et limpide; un sérum de syphilitique se prendra en gelée homogène plus ou moins opaque.

Aussitôt connue, cette réaction, qui simplifiait si agréa-

blement le problème du sérodiagnostic de la syphilis, subit de nombreuses critiques.

Pauzat (97) comparant la réaction de Gaté et Papacostas à celle de Bordet-Wassermann conclut :

sur 11 sérums à B.W. +	11 y eut	3 G.P. +	et 8 -
sur 46 " " à B.W. -	" " "	40 G.P. -	et 6 +

Papacostas et Gaté (95) voulant préciser leur méthode étudièrent l'action du formol en quantité croissante sur le sérum.

Il se forme aussitôt :

- 1°) Petits grains en suspension
- 2°) Virage au vert pâle et fluorescence
- 3°) Traînées opaques blanc laiteux
- 4°) Petits coagula flottant dans un liquide clair

mais si l'on attend 24 heures les coagula tombent au fond et si le sérum est celui d'un syphilitique le liquide se prend en gelée. Bessemans (10-11-12-13) fit une étude détaillée de la réaction: il constata que les sérums se gélifient plus vite après chauffage à 56°, mais que ce fait n'a pas de rapport avec la destruction du complément; il serait dû à une concentration du sérum à cette température. En particulier tous les sérums chauffés à 56° pendant 7 heures deviennent formol gélifiants en 5 minutes. La comparant à la réaction de Wassermann il en conclut qu'elle n'est guère plus fréquente chez les syphilitiques que chez les non syphilitiques. Chez ces derniers on l'observe plus souvent chez les malades. Elle serait donc fonction d'un trouble pathologique général.

L'addition de sels à l'état solide (ClNa , So^4Mg , $\text{So}^4(\text{NH}_4)_2$), accélère la formol-gélification; celle de solution concentrée de ces sels la retarde (le sulfate de magnésium la retarderait moins). Des doses plus fortes de formol, diluant le sérum, retardent le phénomène.

D'après Mills (86) la substance donnant cette réaction est précipitée du sérum avec l'euglobuline.

Strauss et Kautnizt isolant les euglobulines et les albumines du sérum, ont montré que les solutions d'euglobulines sont gélifiées très rapidement, alors que celles d'albumines ne se gélifient pas. L'addition d'une certaine quantité d'albumine à un sérum formol-gélifiant retarde la formation du gel par le formol.

En ce qui concerne la valeur diagnostique de la réaction, Gaté et Papacostas (47-48) estiment que si la formol-gélification est fréquente dans la syphilis en moins de trois jours,

elle l'est aussi dans de nombreuses autres maladies: fièvre typhoïde, tuberculose pulmonaire, erysipèle, etc...

Roy (106) lui reconnaît une valeur dans le diagnostic de la syphilis tertiaire, mais Nicolau de Bettencourt (92) la juge de valeur nulle dans la syphilis.

En ramenant à 1 goutte la quantité de formol ajoutée dans la réaction, Napier en a fait une très bonne réaction pour le diagnostic du Kala-azar: le sérum se prend alors en gelée en 1 à 2 minutes, devient blanchâtre en 3 à 20, se solidifie complètement en devenant totalement opaque. Ce phénomène disparaît avec plus d'une goutte de formol.

Dans le paludisme, la tuberculose, la lèpre, la réaction est beaucoup plus lente et moins intense.

Pour Sarreilhé (108) la formol leucogélification ainsi décrite est primordiale pour le diagnostic du Kala-azar; elle le serait également dans celui de la leishmanniose canine, de la Trypanosomiasis des chameaux; mais elle n'aurait pas de valeur dans la lèpre.

Ainsi cette réaction partie pour être un séro-diagnostic de la syphilis est devenue une méthode précieuse pour celui du Kala-azar.

L'action du formol sur les protéines du sang a également été employée par Costa (32) qui utilise le plasma en présence de novocaïne:

Dans un tube à centrifuger conique, on met successivement:

Novocaïne à 2% dans l'eau physiologique fraîche	1 cm ³ 5
Citrate de sodium à 5%.....	III gouttes
Sang du doigt (chute directe).....	III gouttes

On ajoute alors au liquide

Formol du commerce (chute directe).....	I goutte
---	----------

Normalement il apparaît un trouble au bout de 15 minutes. Cette apparition est accélérée dans les infections, cancers, affections hépatiques. La notation s'effectue en défalquant de 15 le nombre de minutes nécessaires pour l'apparition du trouble: un trouble apparaissant en 10 minutes, se dira 15-10= 5

Nous avons vu qu'une grande quantité de formol inhibe la réaction de Gate-Papacostas, appliqué au diagnostic de Kala-azar. Si l'on ajoute une solution de néostibosane (paraaminophénylstibiato de diéthylamine, on obtient un précipité qui serait spécifique des infections Leishmaniennes

sérum.....	0 cm ³ 5
solution à 10% neostibosane..	4 gouttes
formol officinal.....	0 cm ³ 5

formation de gros flocons et gélification.

(Chopra et W.N. De (26) Nattan Larrier et Grimaud-Richard (91) Cartuna) (24)

En 1924 Benadelli (8) fit connaître une réaction colorée de la syphilis, mais qui n'eut pas de suite :

Au sérum on ajoute du formol puis une solution de nitrate d'argent ammoniacal.

Un sérum normal donne une coloration jaune ambré, celui d'un syphilitique se décolore.

L'auteur n'a pas donné d'explication à sa réaction.

CONCLUSION

Nous venons de voir que l'obtention d'un séro diagnostic des principales maladies : syphilis, tuberculose, cancer, etc... a tenté bien des auteurs. Malheureusement ils ont dû dans la plupart des cas, reconnaître la non spécificité de leurs réactions. Si les réactions de la syphilis qui emploient une suspension de phospholipides, plus ou moins enrichie en cholestérol ou en résines, semblent à peu près spécifiques, il n'en est pas de même de la plupart des autres qui ont cependant l'avantage en général, d'une grande simplicité. C'est que toutes les réactions reposent sensiblement sur le même principe : déséquilibre des colloïdes du sérum. Or, comme nous l'avons vu à l'étude de chaque réaction ce déséquilibre se traduit généralement par une aptitude plus grande de la fraction globulinique à flocculer.

Cette aptitude peut provenir de plusieurs facteurs :

- 1°) Augmentation des globulines
- 2°) Diminution de la sérum albumine
- 3°) Modification qualitative des globulines du sérum

1°) Augmentation des globulines : chez les sujets infectés la quantité des globulines tend souvent à s'élever de façon appréciable. Depuis les travaux de Howe (62) on sait que le sérum du veau nouveau-né, ne contient pas de globulines; elles apparaissent dès que le veau a absorbé du colostrum. Des différences de teneurs en globulines avec l'âge ont été observées chez l'homme. L'apparition des anticorps coïncide avec celle des globulines; de plus l'immunisation enrichit le sérum en globulines (Loehlin) (81). De nombreuses maladies déterminent l'augmentation des globulines: tuberculose, malaria, grippe, typhoïde,

Si on sépare les globulines et les albumines du sérum et qu'on les traite chacune de la même manière:

avec les globulines: aucune précipitation
avec les albumines : formation d'un précipité.

Si on mélange albumines et globulines: pas de précipité dans les mêmes conditions.

Et Fisher en conclut: la globuline serait donc la phase protectrice de l'albumine. Ces travaux qui datent de 1922 n'ont pas éveillé d'écho.

3°) MODIFICATION QUALITATIVE DES GLOBULINES.

Les modifications des globulines survenant au cours de certains états pathologiques sont peut-être non seulement quantitatives mais aussi qualitatives. Lorsque les globulines sont produites en quantité excessives, il n'est pas certain qu'elles restent tout à fait identiques aux globulines normales; elles varient aussi dans une certaine mesure selon les maladies (J. Bordet) (15). On a montré que chez le cheval les anticorps antiexotoxines (donc antiprotéides) se trouvent dans les pseudoglobulines, alors que les antiendotoxines (donc antipolyosides: pneumocoque, typhoïde...) se rencontrent dans les euglobulines (Graber) (54). Il est donc probable que les fractions globuliniques en jeu ne sont pas exactement les mêmes dans les diverses réactions, trahissant l'instabilité colloïdale (J. Bordet). Pour Trenszt (118) par exemple l'euglobuline du sérum paludéen n'est pas absolument identique à celle du sérum normal; elle aurait pour la mélanine une "affinité supérieure". (120) Il en est de même, nous l'avons vu, pour la globuline du sérum syphilitique qui subirait une différenciation d'ordre électrostatique.

Les différents anticorps n'ont pas chez l'homme le même poids moléculaire, les mêmes constantes de sédimentation, de diffusion, le même point isoélectrique.

L'anticorps antipneumococcique a une masse moléculaire de 195.000 une constante de sédimentation $S_{20} \times 10^{13}$ de 7,4, alors que celui actif dans la réaction de Wassermann a une masse moléculaire de 1.130.000 et une constante de sédimentation de 36,6 (Kabat) (64)

Dernièrement Wiedemann (134) a montré qu'il faut considérer les sérums pathologiques, que comme des modifications quantitatives des sous-fractions des globulines des sérums normaux. Par conséquent nous pouvons déceler dans toutes les réactions de floculation un double phénomène:

a) Abaissement du rapport albumines , soit par augmentation globulines
des globulines, soit par diminution des albumines, soit par les deux à la fois.

b) une modification qualitative des globulines.

Lorsque ces modifications sont suffisamment importantes et individualisées, la réaction de floculation qui les décèle peut être spécifique de la maladie en cause. Mais ceci n'est généralement pas le cas et explique le manque de spécificité de la grande partie de ces réactions.

CHAPITRE II

RECHERCHES PERSONNELLES SUR LA FLOCCULATION DES PROTEINES SERIQUES APRES ADDITION DE SOLUTIONS SALINES

A.- Mise au point d'une technique d'étude.

Nous avons cherché à combiner l'action des électrolytes avec celle des substances qui à température normale (18°-20°) provoquent une précipitation des protéines: alcool, acétone, formol, etc...

Si on admet que les protéines sont ampholytes et qu'en milieu alcalin elles sont ionisées négativement elles donneront en présence des cations, provenant des solutions salines, des composés du type protéinate de cation; composés qui peuvent ou non rester en solution. Suivant la concentration en sel ajouté les protéines seront "saturés" ou non, et subiront plus ou moins l'action de réactifs précipitants.

Or, nous venons de voir que les différentes globulines avaient des vitesses de migration électrophorétique différentes, des masses moléculaires différentes, des constantes de sédimentation différentes, des charges électriques différentes. En présence des cations des électrolytes ajoutés, il y a tout lieu de croire qu'elles ne se comporteront pas de la même manière; comportement qui peut rester invisible d'ailleurs. Aussi nous était-il permis de penser que l'addition d'un réactif tel que l'alcool ou le formol en quantité très progressive, nous permettrait de saisir d'une façon visible, les différences existant dans les sérums pathologiques quant à leur répartition en protéines diverses, après modification par les électrolytes.

Principe de la méthode.-

On ajoute à des quantités fixes de sérum sanguin, des quantités croissantes de solutions salines et par affusions successives des quantités fixes d'alcool. On note l'état d'opacité du liquide après chaque addition de réactif. Cette méthode est donc dérivée de "l'indice d'alcool" de Loeb (80) avec cette différence essentielle que la réaction se produit en présence de sels, et que le sérum se trouve dilué.

1°) Le sérum. - Le sang est prélevé par ponction veineuse au pli du coude et recueilli dans un verre propre et sec; après

coagulation spontanée à la température du laboratoire, il est placé à la glacière jusqu'à l'emploi qui doit avoir lieu le lendemain. Dans ces conditions le sérum exsudé est clair, sinon il sera centrifugé et présente un pH voisin de 8,4 (pris au potentiomètre Jouan). Comme l'a montré Prud'homme (L.C.) le chauffage du sérum ou son vieillissement inhibe la floculation par départ de CO₂, le pH pouvant alors dépasser 8,6.

Pour Doladilhe (37) le chauffage du sérum, ou son vieillissement augmente son pouvoir dispersant vis-à-vis des hydrosols, donc sa stabilité.

Achard (1) étudiant la floculation par l'eau distillée a montré que le chauffage préalable du sérum, le protège contre l'action floculante de l'eau distillée et que le volume moyen des particules de globuline qui se séparent dans ces conditions est fortement diminué. Un temps de chauffage assez long peut même inhiber complètement la floculation par l'eau distillée. Plus récemment Van der Scheer, Wyckoff et Clarke (122) ont mis en évidence l'action du chauffage sur le tracé électrophorétique: il tente à se former un seul constituant se déplaçant avec la vitesse des β globulines. Par conséquent nous emploierons du sérum récent et non chauffé pour lui laisser toute son "aptitude à floculer".

2°) Les solutions salines. - Elles sont obtenues par dissolution dans l'eau distillée, possédant un pH voisin de 6,2 des sels que nous voulons étudier. Ceux-ci sont exclusivement des produits Poulenc, marqués "Pur pour analyse". Nous n'avons utilisé que des flacons décachetés par et pour nous-mêmes (ce qui est particulièrement important pour les produits hygroscopiques ou efflorescents). Le premier sel utilisé a été le chlorure de sodium pour lequel nous avons employé des solutions décimales en volume 10%, 1%, 1 o/oo, 1 o/ooo; tous les autres sels employés ont été ramenés moléculairement à ce taux. Etant donné que la solution à 10% de chlorure de sodium correspond à une solution $\frac{M \times 10}{5,85}$ pour 1.000 cm³, le titre de la solution de base sera

donc de $M \times 1,71$ et nous emploierons les solutions $M \times 1,71$, $\frac{M}{10} \times 1,71$, $\frac{M}{100} \times 1,71$ et $\frac{M}{1000} \times 1,71$ par litre.

Les doses de sel ajoutées à une même quantité de sérum devraient se faire en progression logarithmique. Cependant nous avons utilisé une progression d'emploi plus facile. 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1.000 etc... Lorsque la floculation semble intéresser 2 tubes consécutifs, nous fractionnons l'espace en doses intermédiaires pour essayer de localiser exactement le seuil de floculation.

L'expression "sel neutre" généralement employée par les auteurs signifie seulement la saturation exacte des valences acides et alcalines, mais elle ne préjuge absolument pas de la neutralité ionique de la solution.

Il est assez paradoxal d'appeler sel neutre, le phosphate trisodique dont la solution M o/oo a un pH supérieur à 10, le phosphate triammonique dont la solution M x o/oo a un pH de 9,65 ou le chlorure d'aluminium dont la solution M o/oo a un pH inférieur à 3. Il est évident que l'action de ces "sels neutres" sur les solutions protéiques sera différente toutes considérations de valence prises à part.

Przylecki (102) ajoutant de l'alcool à 85° (10 cm³) à une solution de gélatine purifiée (10 cm³) de pH 5,1 donc au voisinage de son point isoélectrique, constata une précipitation avec coagulation de la gélatine. Mais si avant l'alcool on ajoute des "sels neutres" en quantité suffisante il y a seulement opalescence ou même clarification totale. De cela il conclut: l'addition de doses déterminées d'électrolytes provoque une dissolution de la gélatine au point isoélectrique par la formation de potentiels de micelles. Celle-ci s'obtient difficilement et incomplètement avec le chlorure de sodium, cation monovalent, plus facilement avec le chlorure de magnésium, cation divalent, et enfin très facilement avec le chlorure d'aluminium, cation trivalent. Or, si le chlorure de sodium laisse bien la gélatine à son point isoélectrique, il n'en est plus de même du chlorure de magnésium, dont les solutions peuvent aller jusqu'à pH 7,65 suivant la concentration, ni surtout du chlorure d'aluminium, dont les solutions sont très acides. C'est pourquoi pour la plupart des sels employés nous avons pris:

1°) le pH des solutions Mx1,7l; $\frac{M}{10} \times 1,7l$; $\frac{M}{100} \times 1,7l$; $\frac{M}{1000} \times 1,7l$

2°) le pH obtenu après mélange de ces solutions avec le sérum

3°) le pH obtenu après chaque addition d'alcool.

Pour éviter les "actions de sels" sur les colorants pour pH nous avons utilisé le potentioph-mètre de Jouan à électrode de verre.

Chaque sel étudié nous a nécessité, par sérum plus de 50 déterminations. Cela nous a permis d'étudier dans quelle mesure la valence des ions peut jouer un rôle, compte tenu du pH du milieu.

3°) L'alcool. -

L'alcool absolu est d'un emploi difficile en raison de son hydratation à l'air humide d'une part, et d'autre part son mélange avec les solutions aqueuses cause un dégagement de chaleur assez important. Aussi nous avons préféré utiliser l'alcool à 90°, de meilleure conservation. Un titre plus faible nécessiterait des affusions plus importantes avec comme conséquence une dilution du milieu. Pour 0 cm³ 5 de sérum et 0 cm³ 5 de solution saline, soit donc 1 cm³, nous ajoutons 0 cm³ 1 à chaque fois;

en effet nous voulions saisir la première précipitation causée par la plus petite quantité d'alcool. Entre chaque affusion nous attendons 5 minutes temps évidemment arbitraire, mais qui permet à l'alcool d'agir sans allonger trop la durée de l'expérience.

4°) Appréciation de la floculation.

Celle-ci pour être exacte devrait se faire au photomètre; mais dans la technique que nous employons, chaque sérum étudié nécessiterait 90 lectures photométriques, dont 15 devraient se faire en moins de 5 minutes au total. Nous avons dû renoncer à l'emploi de cet appareil et établir une appréciation arbitraire mais simple :

- + louche faible, laissant une vision claire des barreaux d'une fenêtre
- + louche plus intense, les limites des barreaux de la fenêtre s'estompent nettement.
- ++ trouble important mais laissant cependant percevoir des différences d'intensité lumineuse.
- +++ le liquide est opaque.

L'inconvénient de cette méthode de notation est de donner une expression discontinue d'un phénomène généralement continu.

Pour exprimer plus commodément la valeur de la précipitation pour les trois premières additions d'alcool on affecte:

au signe + la valeur 1/2
 au signe + la valeur 1
 au signe ++ la valeur 2
 au signe+++ la valeur 3

et on additionne les intensités de floculation ainsi chiffrées.

Après plusieurs essais nous avons donc mis au point la technique suivante :

N° des tubes	: 1	: 2	: 3	: 4	: 5	: 6	: 7	: 8	: 9	: 10	: 11	: 12	: 13	: 14	: 15
S m	:05	:0,5	:05	:05	:05	:05	:05	:05	:05	:05	:05	:05	:05	:05	:05
eau distillée	:05	:0,4	:03	:0	:04	:03	:0	:04	:03	:0	:04	:03	:0	:0	:05
Sol. à 1/10000	:0,1	:02	:05	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Sol. à 1/1000	:	:	:	:	:01	:02	:05	:	:	:	:	:	:	:	:
Sol. à 1/100	:	:	:	:	:	:	:	:01	:02	:05	:	:	:	:	:
Sol. à 1/10	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:01	:02	:05	:	:
Sol. saturée	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:05	:

on agite

alcool à 90° :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :
: : : : : : : : : : : : : : : :
On agite - attend 5' - Note le trouble - puis ...

alcool à 90° :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :01 :
: : : : : : : : : : : : : : : :
On agite - Attend 5' etc...

Nous nous sommes presque toujours arrêtés à la cinquième addition d'alcool. A cette dose, la précipitation obtenue dans le témoin sans électrolytes atteint déjà ++ ou même +++ pour les sérums normaux et il est facile de saisir s'il y a eu augmentation ou diminution de la floculation.

B

FLOCULATION DES SERUMS HUMAINS NORMAUX OU PATHOLOGIQUES PAR L'ALCOOL EN PRESENCE DE SOLUTIONS SALINES

Les sérums que nous avons utilisés pour effectuer ces essais proviennent des sangs apportés au Laboratoire de Pharmacie de l'Hôpital Bichat, d'abord, de l'hospice de Bicêtre en suite, de 1943 à 1947.

Nous employons le sérum restant après l'exécution des examens prescrits. Dans ces conditions, le sérum est quelque fois frais, du jour même, mais généralement il a subi un séjour en glacière de 24 heures.

Le diagnostic que nous indiquons est celui que nous a donné le médecin ayant demandé l'analyse. Malheureusement notre technique nécessite une assez grande quantité de sérum (7 cc.5) ce qui a restreint le nombre de nos expériences.

De plus la variété dans les cas pathologiques des sujets à notre disposition n'a pas été aussi grande que nous l'aurions désiré.

Nous avons classé les sels étudiés suivant l'anion, puis le cation:

I - SELS A ANIONS MONOVALENTS

Seuls ont été employés les chlorures.

a) à cations monovalents

ont été étudiés: chlorure de sodium
chlorure d'ammonium

I°) CHLORURE DE SODIUM

La solution de base est à 10 gr. de sel pour 100 cm³ de soluté. Pour les sérums normaux, la floculation, suivant la technique précédemment décrite, a fourni le schéma suivant :

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
cm ³															
alcool 0,1															
0,2	+	+	+	+											+
0,3	+	+	+	+	+	+	+	+							+
0,4	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+				++
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+++

Notation pour 0,3 d'alcool
1.5 1.5 1.5 1.5 0.5 0.5 0.5 0.5

Rôle du pH : le sérum utilisé avait un pH de 0,2 : les solutions de chlorure de sodium ont le pH de l'eau utilisée pour les préparer. Mélangées au sérum elles ne font pas varier son pH.

Résultats : sur 20 sérums étudiés de cette façon nous en avons trouvé 10 qui présentaient ce schéma.

3 sérums d'ictériques nous ont donné une précipitation plus intense nécessitant moins d'alcool, telle que

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>
0,1	+	+	+	+	+	+	+	+							+
0,2	++	++	++	++	++	++	+	+	+						++
0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+					+++
0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+				+++
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+		+++
pour 0,3															
d'alcool	6	6	6	6	6	6	4,5	4,5	2,5	0,5					

Pour 3 sérums de sujets atteints d'oedèmes, dont les protéines sont fortement hydratées, la précipitation est moins intense.

Tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
soit pour 0cm ³³	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5							
d'alcool													

4 sérums provenant de syphilitiques ont donné une précipitation normale.

Donc pour le chlorure de sodium, sel neutre, l'intensité de la floculation par l'alcool est inversement proportionnelle à la quantité de sel ajoutée (le tube 10 correspond sensiblement à la solution isotonique : 10 pour 1.000)

Les sérums d'ictériques précipitent plus facilement.

Les sérums d'oedémateux précipitent moins fortement. Il en est de même des sérums chauffés 1/2 heure à 56°.

Les sérums conservés en glacière 6 jours précipitent par contre plus intensément.

2°) CHLORURE D'AMMONIUM P.M. 52,5

La solution de base M x 1.71 renferme 91 gr. 45 par litre.

Résultats semblables à ceux du chlorure de sodium, sauf dans les fortes concentrations salées où la floculation est légèrement moins intense, davantage retardée; dans les concentrations moyennes elle serait légèrement plus importante.

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
alcool à 90°															
0,1															
0,2	+	+	+	+	+	+									+
0,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+
0,4	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+					++
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+		+++
station pour 0,3															
alcool	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1	0,5	0,25	0,5	0,5					

Rôle du pH : Le chlorure d'ammonium est un sel formé de 2 ions acides. Dissociés dans l'eau, ses deux ions n'ont pas la même valeur, ses solutions ont un pH qui varie suivant la concentration.

N° des tubes	1	4	7	10	13
Eau distillée - sol					
	<u>Mxl.71</u>	<u>Mxl.71</u>	<u>Mxl.71</u>	<u>Mxl.71</u>	<u>Mxl.71</u>
	1000	100	10		
pH	6.25	6.20	6.10	5.7	5.2
après mélange avec un sérum de pH 8,7					
	8,7	8,7	8,55	8,10	7,50

Résultats : Sont sensiblement les mêmes que ceux du chlorure de sodium, avec les mêmes différences en ce qui concerne les sérums d'ictériques, d'oedémateux.

b) ANIONS MONOVALENTS ET CATIONS DIVALENTS

1°) CHLORURE DE MAGNESIUM

Cl₂Mg.6 CH₂ - P.M. 203.33

La solution de base Mx 1;71 renferme 347 gr. 60 par litre

Nous avons dû ajouter les tubes intercalaires 9₁ et 9₂ correspondant respectivement à 0,3 et 0,4 de solution $\frac{M}{10} \times 1$.

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	9 ₁	9 ₂	10	11	12	13	14	15
alcool 0,1									+								
0,2								+	+	+	+	+					
0,3	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+			+
0,4	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	++	++	++	+	+	+		+
0,5	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++	+		+++

Notation pour

0,3 d'alcool

0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 1.5 1.5 3.5 1.5 1.5 1.5 0.5 0.5

0.5.

Après 24 heures de repos le précipité est généralement bien déposé avec liquide clair dans les tubes 9 et voisins. Le phénomène dépend presque exclusivement de la température; il a toujours été constaté au-dessous de 15° en large zone.

Rôle du pH : les solutions de chlorure de magnésium ont un pH qui varie suivant la concentration.

n° des tubes	I	4	7	10	13
	Eau dis.	Sol Mx 1;71 1000	Sol Mx 1.71 100	Sol Mx 1.71 10	Sol Mx 1.
pH obtenu	6.2	6.25	6,3	6,4	7.65
après mélange	avec				
un sérum de	8,5	8,4	8,3	8,2	7.65
pH 8,5					
après alcool					
0,1	8,5	8,35	8,25	8,20	7.65
0,2	8,4	8,30	8,20	8,15	7.60
0,3	8,3	8,25	8,15	8,10	7.60

Résultats : Le chlorure de magnésium donne une précipitation, avec maximum en 9, qui apparaît pour ce tube avec seulement 0,1 d'alcool, dose bien inférieure à celle du témoin aqueux.

Le pH ne semble jouer aucun rôle dans cette floculation qui apparaît pour pH 8,25 alors que dans le cas du chlorure d'ammonium cette valeur est obtenue dans le tube 9 également et correspond à une protection.

Sur 75 sérums essayés, nous avons trouvé :

précipitant initialement dans les tubes				Taux pour 0,3 d'alcool
7	8	9	Néphrite azotémique cardiaque décompensé	2,5 1,5
	8	9	Parturiente à terme	3,5
		9	les sérums normaux et hypertension	4
			Ictère hémolytique	4
	8	9 9 ₁ 9 ₂	Néphrose lipofidique Néphrite azotémique Artériosclérose	2,5 1,5 1,5
		9 9 ₁	Ictère simple Cardiaque avec oedèmes Syphilis Sclérose en plaques Sclérose tubéreuse Parturiente à terme	3,5 3,5 2,5 3 1,5 5
		9 ₁	2 syphilis 2 insuffisance cardiaque sans oedème Ictère banal	2 et 3,5 3,5 1,5
		9 9 ₁ 9 ₂	2 syphilis 1 diabétique Parturiente à terme	2 et 2,5 3,5
		9 ₁ 9 ₂	Syphilis	4,5
	9	9 ₁ 9 ₂ 10	Ictère	
		9 ₂	2 syphilis 2 ictères tuberculose néphrite mercurielle	3,5 2,5 6
		9 ₁ 9 ₂ 10	6 syphilis	3 à 1,5 et 3 à 3,5
		9 ₂ 10	syphilis hypertension	3,5 4

Nous n'avons malheureusement pas pu avoir de sérums de malades atteints de paludisme, Meishmanioses, pas davantage de typhiques ou de tuberculeux.

Nous pouvons cependant en tirer quelques conclusions.

Les sérums de malades atteints de néphrites, néphroses, précipitent avec des solutions salines plus diluées, le précipité obtenu est moins intense - (1,5 à 2,5)

Ceux d'ictériques demandent peu d'alcool pour flocculer, flocculat est abondant (3,5 à 4)

Les sérums de syphilitiques nécessitent des doses élevées de chlorure de magnésium pour précipiter. Le flocculat est d'intensité moyenne, sans rapport direct avec la maladie.

Les malades atteints d'hypertension ont un sérum flocculant et abondant (4).

Les sérums chauffés 1 h. à 56° sont plus stables, il en est de même des sérums de cobaye; ces derniers donnent une précipitation en large zone n'apparaissant que pour des doses d'alcool importantes (taux 1,5 à 2)

2°) CHLORURE DE CALCIUM $Cl_2 Ca \quad 6 \quad OH_2 = 219$

La solution de base M x 1,71 renferme 374 gr.51 par litre

Résultats du même ordre que ceux obtenus avec le chlorure de magnésium, quoique la zone initiale de flocculation soit un peu décalée vers les fortes concentrations.

N° des tubes	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>
Alcool 0,1								±	±	±					
0,2							±	±	+	+	±				
0,3	±	±	±	±	±	±	+	++	++	++	++	±			
0,4	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+	±		±
0,5	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		++

notation pour

0,3 d'alcool 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 1,5 3 3,5 3,5 2,5 0,5 0,5

Après 24 heures nous obtenons également l'éclaircissement des tubes 9 et voisins.

Rôle du pH: Les solutions de chlorure de calcium ont un pH qui varie peu avec la concentration.

N° des tubes	I	4	7	10	13
	eau distillée	Sol M x 1,71	Sol M x 1,71	Sol M x 1,71	M x 1,71
		1000	100	10	
pH obtenu	6,2	6,25	6,3	6,35	6,50
après un mélange					
avec un sérum de					
pH	8,5	8,5	8,50	8,45	8,15
7,35					
après alcool	0,1	8,5	8,5	8,4	8,15
	0,2	8,45	8,45	8,4	8,10
	0,3	8,40	8,35	8,30	8,10
					7,30

Résultats: le chlorure de calcium donne une précipitation avec ----- maximum en 9,10 correspondant à un pH de 8,30 à 8,15 donc identique à celui du chlorure de magnésium. Nous retrouvons les mêmes différences suivant l'état pathologique du sujet.

4°) CYANURE MERCURIQUE $(CN)_2 Hg = 252,62$

La solution de base Mx1,71 renfermerait 4,31 gr 90 par litre. Mais là encore nous devons supprimer les tubes 11-12 et 13; car ce sel n'est pas soluble à ce taux. Nous emploierons donc la solution M x 0,71 renfermant 43 gr.19 de cyanure mercurique par litre. 10

des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	...	14	15
avant alcool													
Alcool	0,1												
	0,2											±	
	0,3	±	±	±	±	±	±	±	±	±		±	±
	0,4	±	±	±	±	±	±	±	±	±		±	±
	0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+		++	++
	0,6	++	++	++	++	++	++	++	++	++		+++	++

Ainsi le cyanure de mercure n'exerce aucune influence sur la précipitation des protides du sérum par l'alcool; c'est à peine si la solution saturée permet une précipitation légèrement plus intense. Il est évident que dans ces conditions, l'origine du sérum ne peut influencer que sur la quantité d'alcool comme pour la précipitation par l'eau distillée.

Rôle du pH: le cyanure de mercure ne fait pas varier le pH de l'eau distillée qui sert à le dissoudre.

Toutes ces propriétés s'expliquent parfaitement par le fait que ce sel n'est pas ionisé en solution. Celle-ci ne renferme que des molécules électriquement neutres.

3°) CHLORURE MERCURIQUE - $\text{Cl}_2 \text{ Hg} = 271,52$

La solution de base M x 1,71 renfermerait 464 gr.2, mais le chlorure mercurique est insoluble à ce taux et nous avons supprimé les tubes 11, 12 et 13. Nous partons donc de la solution M x 1,71 renfermant 46 gr.42 par litre.

10

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	...	14	15
avant l'alcool					±	+	+++	+++	+++	+++		+++	
alcool 0,1					±	±	+++	+++	+++	+++		+++	
0,2			±	±	+	+	+++	+++	+++	+++		+++	
0,3	±	±	+	±	±	++	+++	+++	+++	+++		+++	±
0,4	+	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++		+++	+
0,5	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++	++

Dans nos conditions d'expérience le chlorure mercurique fait précipiter les sérums à la dilution de 1 pour 1.000 et au-dessus, même sans alcool.

Nous avons retrouvé sur les sérums examinés les différences de floculation indiquées par Gros (Lacit) suivant la concentration en sublimé; en effet la floculation en 6,5 et même 4 est plus importante avec les sérums d'ictériques.

Rôle du pH : Les solutions de chlorure mercurique sont très acides.

5°) LACTATE DE CALCIUM

La solution de base est la solution M x 1,71 ce sel étant insoluble aux concentrations supérieures. 10

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	...	14	15
Alcool à 90° 0,1							±						
0,2						±	±	±				±	
0,3	±	±	±	±	±	±	+	+	±			±	±
0,4	+	+	+	+	+	+	++	++	++	±		+	+
0,5	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++		+	++

Même aspect de précipitation que le chlorure de calcium légèrement décalé vers les concentrations plus faibles.

C) ANION MONOVALENT et CATION CONTENANT UN METAL HEXAVALENT

NITRATE D'URANYLE $(\text{NO}_3)_2 \text{ UO}_2$ $6.\text{OH}_2 = 502$

Nous employons la solution moléculaire à 502 gr. par litre

La solubilité très grande de ce sel le permet.

° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
alcool 0								+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0,1								++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0,2	±	±	±	±	±	±		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	±
0,3	+	±	±	±	±	±	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	±
0,4	+	+	+	+	+	+	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,5	++	++	++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Le radical Uranyle fonctionne comme divalent, mais nous obtenons une précipitation d'un type spécial; en effet, si au-dessus du tube 9 (solution à 25 gr. par litre) il y a précipitation massive, nous trouvons un minimum en 7 (solution à 5 pour 1.000). Au-dessous de ce taux il ne semble plus y avoir d'action, la précipitation est la même qu'en eau distillée.

Rôle du pH - Les solutions de nitrate d'Uranyle sont très acides.

II - SELS À ANIONS DIVALENTS

I°) à cations monovalents

a) Sulfate de sodium $\text{SO}_4 \text{ Na}_2 10 \text{ OH}_2 = 322,21$

La solution de base renfermerait $M \times 1,71 = 550 \text{ gr. } 80$ par litre. Le sulfate de sodium n'étant pas soluble à une telle concentration le tube 13 est supprimé.

des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	...	14	15
cool 0														+	
0,1															
0,2														±	
0,3	±	±	±	±	±	±	±					±		+	±
0,4	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	++		++	+
0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++		+++	++

Rôle du pH : Le sulfate de sodium ne fait pas varier le pH de l'eau distillée utilisée pour la préparation des solutions.

Résultats : Aux concentrations faibles et moyennes en sel nous retrouvons l'action du chlorure de sodium. Pour la solution saturée il y a d'abord précipitation sans alcool. Celui-ci apporte une dilution du milieu avec dissolution du précipité qui se reforme pour des doses plus fortes. Dans le tube 12 la floculation est la même qu'en eau distillée, ce qui donne l'aspect de la courbe avec minimum.

Au point de vue de l'état pathologique des malades dont nous avons expérimenté les sérums, nous retrouvons les mêmes variations qu'avec le chlorure de sodium. Le tube 12 subit ces variations avec un peu plus d'intensité.

b) SULFATE D'AMMONIAQUE



La solution de base M x 1,71 renferme: 225 g.70 de sel

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0														+++	
0,1														+++	
0,2														++	
0,3	+	+	+	+	+	+	+						+	++	+
0,4	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+++	+
0,5	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+++	+++	+++

Rôle du pH - Les solutions de sulfate d'ammoniaque ne sont pas neutres - leur pH varie suivant la concentration:

N° des tubes	I	4	7	10	13
eau distillée		Sol M x 1,71	Sol M x 1,71	Sol M x 1,71	Sol M x 1,71
		1000	100	10	
pH	6,1	6,1	6,1	5,8	5,4
après mélange avec un sérum de pH 8,7	8,7	8,7	8,6	8,1	7,5

Résultats: Nous retrouvons le même aspect de floculation qu'avec le sulfate de sodium mais plus net en ce qui concerne l'action solubilisante des tubes 9-10 et 11 ou au contraire précipitante des tubes 12-13-14. Nous avons obtenu cet aspect de la floculation pour les sérums normaux, pour des sérums d'ictériques bien que plus intense, et pour 3 sérums de syphilitiques. Pour 20 sérums de syphilitiques et un provenant d'un convalescent de typhus grave nous avons obtenu un tableau de floculation tout à fait différent puisqu'il rappelle celui de chlorure de magnésium: maximum en 9-10 retard en 13, que nous représentons:

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0														+++	
0,1														+++	
0,2									+	+				++	
0,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			++	+
0,4	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+		+++	+
0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	+	+++	++

Notre technique nécessitant 7 cm³ 6 de sérum, ce qui nous a bien souvent limité dans nos essais, nous avons expérimenté avec seulement les tubes 9 et 13, qui marquent les différences maxima, avec 0,4 et 0,5 d'alcool, qui semblent les points sensibles.

N° des tubes 9 13

Normaux

Alcool 0,4 +
0,5 +

Syphilitiques

Alcool 0,4 ++
0,5 +++ +

Pour les sérums syphilitiques, qui nous donnaient une réaction de Menicke très positive, nous avons généralement obtenu ce résultat.

Pour beaucoup d'autres sérums syphilitiques, mais aussi pour quelques autres, nous obtenons une floculation intermédiaire, c'est-à-dire le retard en 13 mais sans début de précipitation en 9-10, - telle que:

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0														+++	
0.1														+++	
0.2														++	
0.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			++	+
0.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+++	+
0.5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+++	++

Par conséquent il nous paraît que la floculation des sérums par l'alcool en présence de sulfate d'ammoniaque peut présenter 2 aspects différents: sérums normaux et sérums de syphilitiques avec tous les intermédiaires. Nous n'avons pu comparer ces résultats avec ceux que donneraient des maladies causant une forte perturbation dans les protéines du sang.

2°) ANIONS DIVALENTS - CATIONS DIVALENTS

a) SULFATE DE MAGNESIUM $\text{SO}_4 \text{ Mg} \cdot 7 \text{ OH}_2 = 246,49$

La solution de base Mxl.71 renferme 421 gr.4 par litre.
La précipitation rappelle celle du chlorure de magnésium.

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0.1															
0.2								+	+	+	+	+			
0.3	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+		+
0.4	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	++	+	+
0.5	++	++	++	++	++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++

Rôle du pH. - Le pH des solutions varie légèrement avec la concentration.

N° des tubes	I	4	7	10	13
eau distillée	Sol M x 1,71 1000	Sol M x 1,71 100	Sol M x 1,71 10	Sol M x 1,71	
pH	6.2	6.2	6.25	6.35	6.50
mélangées avec un sérum de pH 8,7	8,7	8,7	8,7	8,45	7.50

RESULTATS

Léger décalage vers les fortes concentrations par rapport au Cl_2 Mg. La solution saturée protège les protéines contre la précipitation par l'alcool, alors que pour un même pH, la solution saturée de sulfate d'ammoniaque favorise cette précipitation. Cette floculation avec maximum dépend donc uniquement du cation divalent.

b) SULFATE DE CUIVRE: $\text{SO}_4 \text{ Cu}-5 \text{ OH}_2 = 249,71$

La solution de base devrait contenir $\text{Mxl},71 = 427$ gr. par litre mais la solubilité limitée de ce sel nous oblige à supprimer le tube 13.

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 ...	14	15
Alcool 0						+	+++	+++	+++	+++	+++	+		
0.1					+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
0.2				+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0.3	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0.4	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0.5	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

On peut noter l'aspect de floculation qui présente un maximum, même sans alcool et la non précipitation dans la solution saturée, qui nécessite 0,2 et 0,3 d'alcool pour donner une floculation nette.

Rôle du pH

Les solutions de sulfate de cuivre sont acides

N° des tubes	I	4	7	10	14
eau distillée	Solution M 1000	Solution M 100	Solution M 10	Sol. saturée	
pH	6.60	4.80	4.70	4.25	3.60
après mélange avec un sérum de pH 7,65	7,65	7,25	5.80	4,60	3,90

3°) ANIONS DIVALENTS - CATIONS TRIVALENTS

a) Sulfate d'aluminium $(\text{SO}_4)_3 \text{ Al}_2 - 18 \text{ OH}_2 = 666,40$

La solution de base devrait contenir $M \times 1,71 = 1139$ gr.30 par litre. Nous sommes limités par la solubilité, au tube 11

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 ...	14	15
Alcool 0							+++	++	+				
0.1						+	+++	+++	+++	+++	+		
0.2						+	+++	+++	+++	+++	+++		
0.3	+	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++		
0.4	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+
0.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+

Nous retrouvons, d'une façon beaucoup plus intense le mode de précipitation des cations divalents.

Ôle du pH

Les solutions de sulfate d'aluminium sont très acides. Ce sel étant facilement déliquescent nous avons essayé le

b) Sulfate d'aluminium et de potassium. - Alun de potassium
 $(SO_4)_3 Al_2, SO_4 K_2, 24.OH_2 = 948,75$

moins soluble la solution de base est $\frac{M}{10} \times 1,71 = 162,23$

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10....	14	15
Alcool 0							+++	+++	+++			
0.1							+++	+++	+++	+++		
0.2							+++	+++	+++	+++		
0.3	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++		+
0.4	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++		+
0.5	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++		++

Il est intéressant de noter cette brusque différence d'action entre les tubes 6 qui précipite comme l'eau distillée et 7 qui précipite totalement même sans alcool.

III - SELS A ANIONS TRIVALENTS

I°) A Cations monovalents

Nous avons étudié les phosphates d'ammonium

a) Phosphate triammonique $(PO_4 (NH_4)_3 = 149$

La solution de base est la solution moléculaire - M o/oo

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0											+	+	+	+	
0.1											+	+	+	+	
0.2										+	+	+	+	+	
0.3	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
0.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
0.5	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	+	++
0.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+++

Rôle du pH : Les solutions de ce sel sont fortement alcalines

N° des tubes	I	4	7	10	13
	eau distillée	Sol $\frac{M}{1000}$	Sol $\frac{M}{100}$	Sol $\frac{M}{10}$	Sol. M
pH	6.3	8.80	9	9.20	9.65
après mélange avec un sérum de pH 8,58,5		8.70	8.90	9.10	9.60

Résultats: Le louche formé avant addition d'alcool dans les tubes 10 à 14 ne s'intensifie que très lentement.

Dans les tubes 13 et 14 il faut 0,8 d'alcool pour obtenir +++ et dans les tubes 11 et 12 il faut dépasser 1 cm³ d'alcool pour obtenir le résultat.

Le minimum à 9 est très stable. Même pour les sérums ictériques, qui précipitent avec moins d'alcool, mais sans décalage dans les tubes, le louche en 9 n'est obtenu que pour 0,4 d'alcool. Donc dans les faibles doses aucune action. Pour la concentration de 7 pour 1000 (tube 9) de la solution ajoutée il y a un minimum quant au début de floculation. Le louche obtenu dans les tubes 11, 12, 13, 14 dès le début est d'une nature différente il n'est pas homogène mais granulaire et reste intact jusqu'à de fortes additions d'alcool. Il y a donc cependant protection des protides contre l'alcool.

b) PHOSPHATE D'AMMONIQUE $(PO_4 H (NH_4)^2 = 132.12$

La solution de base est la solution moléculaire

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0															
0.1														+++	
0.2											+	+		+++	
0.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	
0.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+
0.5	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+++	+
0.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++

Sur tous les sérums étudiés nous avons trouvé ce même résultat. Quelques-uns (affections du foie) précipitent plus intensément mais sans changer l'aspect général.

Ici l'effet solubilisant des solutions salines, se combine avec celui précipitant en 11, 12 vu au sel précédent;

La solution saturée précipite immédiatement totalement comme pour le sulfate d'ammoniaque, avec le même effet solubilisant partiel des premières additions d'alcool.

Rôle du pH - Les solutions de phosphate diammonique ont un pH qui varie légèrement suivant la concentration.

N° des tubes	I	4	7	10	13
	eau distillée	Sol $\frac{M}{1000}$	Sol $\frac{M}{100}$	solution $\frac{M}{10}$	Solution M
pH	6.60	7.60	7.90	7.95	8

après mélange avec un sérum de pH 7,65	7,65	7,65	7.70	7.90	7.95
--	------	------	------	------	------

c) Phosphate Mono-ammonique $PO_4 H_2 (NH_4) = 115$

La solution de base est la solution moléculaire (tube 13)

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0								+	+						
0.1								+	+						
0.2						+	+	+	+	+	+				
0.3	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	++	++	+	+		+
0.4	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+
0.5	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++

Rôle du pH: Les solutions de ce sel sont acides.

N° des tubes	I	4	7	10	13
	eau distillée	$\frac{M}{1000}$	$\frac{M}{100}$	$\frac{M}{10}$	M
pH	6,3	6,1	5,3	4,75	4,05
après mélange avec un sérum de pH 6,7	8,7	8,45	7,70	6,50	5,20

Résultats: sur 50 sérums essayés, ont donné une précipitation initiale à

6	coma urémique
7	2 urémies intense
8	2 syphilis
	2 ictères
7 8 9	8 syphilis
8 9	3 syphilis (sérum chauffé)
9	4 ictères
9 10	1 inconnu

Les sérums d'urémiques précipitent plus intensément: ils nécessitent moins d'alcool (6 pour 0,3 d'alcool) il en est de même des sérums conservés (6 à 8 jours à 2°)

Les sérums chauffés sont plus stables, ils ne précipitent pas sans alcool - 2 sérums, dont l'histoire nous est inconnue, très pâles, très fluides n'ont précipité qu'avec de très fortes doses d'alcool.

d) CITRATE DE SODIUM $(C_6 H_5 O_7 Na_3)_2 \cdot 11.OH_2 = 714,23$

La solution de base est la solution moléculaire; ce sol étant insoluble à cette concentration, nous avons dû supprimer les tubes 12 et 13.

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		14	15
Alcool 0											++		+++	
Alcool 0,1											+		+++	
0,2											-		+++	
0,3	+	+	+	+	+	+			+	+	+		++	+
0,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+++	+
0,5	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+++	++
0,6	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	++	++	+++		+++	+++

La solution saturée fait précipiter immédiatement le sérum. Dans le tube 11 (solution à 142 gr. par litre) l'addition d'alcool fait disparaître entièrement le précipité formé auparavant.

pH : Les solutions de ce sel sont alcalines.

N° des tubes	I	4	7	10	14
	eau distillée	sol. $\frac{M}{1000}$	solution $\frac{M}{100}$	sol. $\frac{M}{10}$	sol. saturée
pH	6.60	7.50	7.85	9	8,9
après mélange avec un sérum de pH 7,65	7,65	7,65	7,80	8	8

2°) ANIONS TRIVALENTS - CATIONS DIVALENTS

a) Phosphate monocalcique $(PO_4 H_2)_2 Ca OH_2 = 252,16$

La solution de base est la solution moléculaire

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0									+						
Alcool 0,1							+	+	++	+			+	+++	
0,2							-	++	+++	+			+	+++	
0,3	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++	++			+++	+++	
0,4	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+
0,5	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Rôle du pH: les solutions de phosphate mono-calciqye sont acides.

N° des tubes	I	4	5	6	7	8	9	10		13
	eau dis-	M			M			M		M
	tillée	1000			100			10		
pH:	6,3	3,8			3			2,5		2
après mélange avec un sérum de pH 8,7	8,7	8,7	8,35	8,1	7,75	6,90	6,5	5,95	4,7	2,4

Résultats: Sur 40 sérums traités par cette méthode, la floculation a débuté dans les tubes.

8 9 2 syphilis
 9 5 ictères
 5 syphilis (sérum chauffé)
 2 névroses lipoldiques - 22 normaux
 8 9 10 3 syphilis

Avec comme les autres sels, les variations d'intensité semblables.

La floculation présente 2 maxima, l'un en 9 comme pour les cations divalents, l'autre en 13-14 comme les anions polyvalents.

IV - SELS A ANIONS TETRAVALENTS et A CATION MONOVALENT

FERROCYANURE DE POTASSIUM $\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{K}_4 - 3, \text{OH}_2 =$

La solution de base est la solution moléculaire.

La solubilité limitée de ce sel, nous oblige à supprimer le tube 13.

Le choix de ce sel à anion complexe a un double but: obtenir un sel à anion tétravalent, et étudier le comportement d'un complexe.

° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15
Alcool 0												+	+++	
0.1												+	+++	
0.2											+	+++	+++	
0.3	+	+	+	+	+	+				+	+++	+++	+++	
0.4	+	+	+	+	+	+				+	+++	+++	+++	
0.5	++	++	++	++	+	+				++	+++	+++	+++	
0.6	+++	+++	+++	+++	++	++				+++	+++	+++	+++	

Aux fortes concentrations il se produit un double phénomène: précipitation des protéines, mais aussi précipitation du ferrocyanure de potassium qui en solution aqueuse concentrée est totalement insoluble dans l'alcool (11-12-14). Cependant l'action sur les protides commençant en absence d'alcool, il n'est pas douteux que nous retrouvons l'action de l'anion polyvalent: précipitation en solution concentrée. Par contre le manque de précipité jusqu'à 0,6 d'alcool, pour les doses moyennes de sel, caractéristique du cation monovalent s'oppose à l'accentuation du précipité par les cations polyvalents. (action qui semble renforcée par la polyvalence de l'anion.

Si nous remplaçons le sérum par 0 cm³ 5 d'eau distillée dans les tubes 12 et 14, l'addition d'alcool précipite le sel suivant le schéma suivant:

N° des tubes	12	14
Alcool 0		
0,1		+
0,2	++	+++
0,3	+++	+++

C'est ce précipité cristallin qui vient se superposer à celui des protéines du sérum.

PH = Les solutions de ce sel sont légèrement alcalines.

CONCLUSION

La précipitation des sérums normaux ou pathologiques, par l'alcool en présence de solutions salines, telle que nous l'avons pratiquée, se produit selon un système à quatre variables; l'origine du sérum, la quantité d'alcool, la nature du sel et la quantité de sel.

I.- RÔLE DE L'ÉTAT PATHOLOGIQUE DU DONNEUR -

a) Augmentation de la floculabilité: Nous avons retrouvé le phénomène signalé par la plupart des auteurs et en particulier par Daranyi, Mac Donagh, Klausner, Chorine, etc... Certains sérums pathologiques sont plus "labiles", présentent une "aptitude plus grande à floculer". Ces sérums sont d'abord ceux qui présentent des réactions de Takata-Ara, Gros, positives, c'est-à-dire les sérums d'ictériques. Cette floculation ne porte d'ailleurs que sur la quantité d'alcool ajoutée, c'est-à-dire que pour une même addition d'alcool les sérums d'ictériques donnent une floculation plus intense que les sérums normaux. La concentration saline ne semble pas avoir un rôle important dans cette discrimination puisque le phénomène se produit globalement dans tous les tubes, y compris le tube témoin en eau distillée. En changeant la nature du sel employé il n'a pas été possible de trouver un anion ou un cation donnant une précipitation élective des sérums ictériques par l'alcool.

En absence d'alcool les sels de métaux lourds tel que le chlorure mercurique permettent d'obtenir une précipitation des sérums ictériques, avec des concentrations salines inférieures à celles nécessitées par les sérums normaux, comme l'avait montré Gros. Par notre méthode, nous obtenons un élargissement vers les premiers tubes de la zone de floculation.

Cette augmentation de la floculabilité, en présence d'alcool, se retrouve pour les sérums de malades qui présentent une augmentation de leurs protéines plasmatiques (hypertendus, etc...)

b) Diminution de l'aptitude à précipiter: Les sérums dont les protéines sont fortement imbibées nécessitent plus d'alcool pour précipiter donc pour une même dose d'alcool (Occ.3) ils donnent une précipitation beaucoup moins intense que celle donnée par les sérums normaux. C'est le cas des sérums de malades atteints d'œdèmes (cardiaques, néphritiques).

Comme pour l'augmentation de la précipitation, la diminution est généralement indépendante du sel employé et se retrouve dans les tubes I et 15 (eau distillée). C'est l'ensemble de la précipitation dans les 15 tubes qui se trouve avancé ou retardé (exception faite pour le chlorure mercurique comme nous l'avons vu),

c) Sérums pathologiques dont la précipitation dépend de la concentration saline: Dans ce cas l'alcool semble bien ne servir qu'à rendre visible les modifications survenues dans l'équilibre du mélange sérum-solution saline; il ne se produit en effet dans la majorité des tubes aucune différence dans l'intensité de la floculation par l'alcool, par rapport aux sérums normaux; mais par contre nous voyons quelques tubes précipiter électivement ou d'autres ne pas précipiter.

C'est ainsi qu'avec le chlorure de magnésium, alors que les sérums normaux présentent une précipitation débutant dans le tube 9 (solution à 13 gr.90 par litre), les sérums de syphilitiques précipitent dans les tubes supérieurs à 91 (solution à 20 gr. 85 o/oo) surtout 9₂ et 10 (solution à 27,40 o/oo et 34, 76°/oo). Les sérums de syphilitiques nécessitent donc une concentration saline supérieure, dans ce cas, pour obtenir la floculation initiale.

Avec le sulfate d'ammoniaque il se produit un phénomène du même ordre. En effet, si les sérums normaux (tout au moins non syphilitiques) donnent une précipitation qui présente un minimum dans les tubes 9 - 10 - 11 (solutions à 9 gr°/oo, 22gr,5°/oo et 45 gr°/oo), de nombreux sérums syphilitiques présentent pour les tubes 9 et 10, surtout 9, un maximum de floculation. Cette inversion de la floculation se retrouve dans le tube 13 (solution à 225 gr, 70°/OO). A cette concentration les sérums normaux précipitent abondamment pour 0 cc.5 d'alcool, les sérums de syphilitiques ne précipitent que faiblement.

Par conséquent, les protéines des sérums de syphilitiques responsables de ces floculations sont, en présence d'alcool, plus solubles, plus stables en solution concentrée, et moins stables en solution de concentration moyenne (environ 10 °/oo) que les protéines de sérums normaux (tout au moins non syphilitiques dans les cas pathologiques étudiés par nous).

Meinficke, dans ses premières réactions de floculation, combinait l'action de son antigène lipidique avec celle de l'eau distillée et de solutions salines de titre varié, pour différencier les sérums normaux des sérums provenant de syphilitiques.

II.- INFLUENCE DES ANIONS ET DES CATIONS DANS LA PRECIPITATION PAR L'ALCOOL.-

Lorsque l'on examine les tableaux représentant la précipitation produite dans le sérum, par l'alcool, en présence de différents sels, il apparaît nettement que l'aspect de la floculation varie selon la constitution du sel employé.

Rôle de l'anion : La précipitation en présence de chlorure de sodium diffère de celle obtenue en présence de chlorure de magnésium, elle se rapproche par contre de celle obtenue en présence de sulfate de sodium ou d'ammonium pour les sérums normaux. Cependant on remarque une différence pour les fortes concentrations (solutions saturées, solution moléculaire):

En présence de sulfates la précipitation est intense, elle est nulle en présence de chlorures. Or cette action des sulfates se retrouve amplifiée pour le citrate de sodium, pour les phosphates, le ferrocyanure de potassium. Par conséquent en solution concentrée, les sels à anions polyvalents précipitent les protéines sériques, ou renforcent l'action de l'alcool sur cette précipitation. Par contre aux faibles et moyennes concentrations salines, il n'y a pas de différence visible entre les sels quant à la valence de l'anion.

Rôle du cation : L'action propre au cation entrant dans la constitution du sel employé, apparaît comme beaucoup plus importante puisqu'elle se fait sentir dans un nombre important de tubes. Les cations tels que sodium, potassium, ammonium ont une activité similaire. En effet, tous les sels renfermant ces cations ont la propriété, aux concentrations faibles et moyennes, de s'opposer à l'action précipitante de l'alcool sur le sérum. Cette action est de plus directement proportionnelle à la concentration. En solution concentrée les chlorures de sodium et mieux d'ammonium, empêchent toute précipitation des protéines sériques par 0 cc.5 d'alcool; lorsque l'anion est polyvalent, les deux ions ajoutent ou opposent leur action suivant le tube et donnent une précipitation présentant un minimum. C'est ainsi que le sulfate d'ammoniaque et le citrate de sodium empêchent mieux que les chlorures, la précipitation dans les tubes 7 et 8, il y a donc là renforcement de l'action solubilisante, alors que dans les tubes 13 et 14 la précipitabilité des protides est fortement augmentée.

Lorsque le cation est divalent l'aspect du tableau représentant la précipitation dans nos 15 tubes est tout à fait différent de celui que nous donnaient les cations monovalents. Pour les sels de calcium et magnésium en effet nous obtenons un "maximum": la précipitation par l'alcool des protéines sériques débute dans le tube 9 (solution à 13 gr.90 de chlorure de magnésium) ou les tubes immédiatement voisins. Cette zone s'étend avec les additions d'alcool. Pour les fortes concentrations (solution saturée, moléculaire nous retrouvons l'effet protecteur des sels à cations monovalents. Cependant le sulfate de magnésium (anion divalent) ne donne pas de précipitation plus forte dans les tubes 13 et 14 comme les sels à anion divalent. Il semble que le cation divalent atténue alors l'action de l'anion. Par contre avec l'anion trivalent, phosphate de calcium, les deux activités sont nettement visibles, en 9 action très forte du cation, la précipitation peut même débiter sans alcool, elle est intense.

En 13 - 14 action de l'anion polyvalent qui donne une précipitation très intense dès la première ou la deuxième addition d'alcool.

Les sels de métaux lourds renforcent en quelque sorte cette action des cations divalents. En effet ils ont la propriété de précipiter directement les protéines même sans alcool, pour certaines concentrations.

Le sulfate de cuivre conserve la présence d'un maximum: les tubes 7 à 11 (solution à 4 gr. 27 ‰, solution à 85 gr. 40 ‰) précipitent sans alcool. La solution saturée et la solution à 171 gr. 8 ‰ (tube 12) nécessitent la présence de l'alcool pour précipiter les protéines sériques, il en est de même des solutions diluées.

Dans les sels de mercure, il faut différencier un sel véritable, plus ou moins ionisable comme le chlorure mercurique, d'un complexe non électrolyte comme le cyanure mercurique. Le chlorure mercurique n'est plus "protecteur" à forte concentration. Au dessus du tube 7 (solution à 4 gr. 642 ‰) la précipitation est totale, sans alcool. Au dessous, elle varie suivant la concentration en sel, et les additions d'alcool.

Le cas du cyanure est tout à fait différent: quelque soit la concentration des solutions, elles n'ont aucun effet sur la précipitation des protéines sériques par l'alcool. Il est évident que l'absence d'ions en solution suffit à expliquer ce phénomène.

Comme cations trivalents nous n'avons essayé que l'aluminium. Les sels ferriques placés en milieu légèrement alcalin, surtout pour les solutions diluées, donnent des sols colloïdaux qui n'ont plus les mêmes propriétés, le liquide est trouble, fortement coloré. Le sulfate d'aluminium nous a donné un aspect très voisin de celui du sulfate de cuivre, avec maximum étalé (tubes 7 et 8); les fortes concentrations ne précipitent qu'après addition d'alcool.

Par conséquent il ressort de tous ces essais que seuls les sels ionisés ont une action sur la précipitation des protéines par l'alcool, que les anions n'influent sur celle-ci qu'en solution concentrée (anions polyvalents) et que par contre les cations jouent un rôle capital; ce rôle dépend d'abord de la valence du cation; mais il semble également que certains cations (mercure par exemple) ont une activité propre. La floculation telle que nous la pratiquons n'est donc pas un simple phénomène physique comme il était courant de l'admettre. Pour nous en convaincre il suffit d'étudier le rôle du pH dans les précipitations.

Rôle du pH - Les tableaux donnant la valeur du pH pour la plupart des sels étudiés, nous ont permis de constater:

1°) que peu de sels sont "neutres" en solution: le chlorure de sodium et le sulfate de sodium sont les seuls qui ne fassent pas varier le pH de l'eau distillée, ni celui du sérum.

2°) que tous les autres sels que nous avons utilisés ont en solution un pH qui varie suivant la concentration.

3°) que le pouvoir tampon du sérum n'est pas suffisant pour éviter les variations de pH causées par l'addition de ces solutions, surtout concentrées; il les atténue seulement.

4°) que la précipitation des protéines sériques n'a pas lieu à un pH déterminé puisqu'il varie pour chaque sel. Cette précipitation peut aussi bien se faire en milieu alcalin, neutre ou acide:

pH 8,5	Citrate de sodium
pH 8,25	Chlorure de calcium et de magnésium
pH 8	Sulfate de magnésium - Phosphate d'ammonique
pH 7,50	Sulfate d'ammoniaque
pH 6	Phosphate mono-ammonique
pH 5,95	Phosphate monocalcique
pH 6,60 à	
5,80	Sulfate de cuivre
pH 5 et au dessous :	Chlorure mercurique
pH 2,4	Phosphate monocalcique

Des valeurs de pH qui correspondent à une précipitation pour un sel, correspondent au contraire à un minimum, une protection pour un autre sel.

Le tube 9 présente le même pH pour le chlorure de magnésium (précipitation) et pour le chlorure d'ammonium (protection).

Les tubes 13 - 14 présentent le même pH pour le sulfate d'ammoniaque (précipitation) et pour le chlorure d'ammonium (protection maxima).

Si nous comparons tous ces résultats à ceux obtenus par Loeb nous constatons quelques différences.

Loeb (80) a montré que les "sels neutres" accroissent la solubilité de la gélatine au point isoélectrique et cela d'autant plus que s'accroît la valence de chacun des ions du sel. De plus étudiant la floculation de l'ovalbumine dénaturée par la chaleur, Loeb a montré que cette précipitation était intense avec les chlorures et sulfates de sodium et de potassium et nulle avec le ferrocyanure de potassium. Si nous avons bien retrouvé certains de ces résultats avec l'alcool comme dénaturant, nous avons vu que cet effet solubilisant ou précipitant dépendait essentiellement de la concentration saline. Il est vrai que Loeb pour éviter les variations de pH opérait en solution diluée.

Il en est de même pour les conclusions de Schultz complétées par Hardy. Lorsque l'on veut précipiter un colloïde de signe donné par addition d'un électrolyte, c'est l'ion de signe électrique opposé à celui du colloïde qui exerce une influence.

Pour une même précipitation, la concentration de la solution saline ajoutée diminue lorsque la valence de l'ion utile augmente. Les protéines en cause dans nos recherches, étant électro-négatives, les cations auront le rôle essentiel. C'est bien ce que nous retrouvons. Mais la présence d'un maximum ou d'un minimum pour certains sels nous oblige à tenir compte, non seulement de la valence du cation, mais de la nature de celui-ci, de la concentration de départ et de la nature et de la valence de l'anion.

C

FLOCCULATION PAR L'ALCOOL DE 2 SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES.-

Ces sérums sont des sérums de chevaux immunisés contre une maladie déterminée. Nous avons choisi des sérums antitoxiques périmés depuis peu. Le Codex indique pour le sérum normal de cheval la composition protéique suivante:

Protides totaux	71 à 74 gr. par litre
Sérum albumine	33 gr.82
Sérum globuline	40 gr.50
Rapport <u>sérine</u> = <u>globuline</u>	1 gr.43

Le résultat de la division de 33,82 par 40,50 peut d'ailleurs étonner.

Si l'on admet pour le sérum humain normal par litre

Protides totaux	70 à 80 gr.
Sérum albumine	45 à 55 gr.
Sérum globuline	25 à 35 gr.
Rapport <u>sérine</u> = <u>globuline</u>	1,20 à 1,80

(Achard, Grigaut et Codounis) (2)

Il y a lieu de penser que ce sérum ne subira pas de la même façon l'action des sels et de l'alcool puisqu'il présente une augmentation de la globuline et une diminution de l'albumine par rapport au sérum humain. Si l'on admet que l'albumine stabilise la globuline, le sérum de cheval doit flocculer plus facilement.

Nous utilisons le sérum antigangréneux de l'Institut Pasteur périmé depuis peu.

Nous avons établi la composition protéique suivante (méthode de Kayser indiquée par P. Fleury) (42)

Protides totaux	93 gr.
Sérum albumine	20 gr.
Sérum globuline	73 gr.

Pour mieux saisir l'influence de l'albumine et de la globuline, nous utilisons également du

Sérum antitétanique purifié à 10.000 unités de l'Institut Pasteur périmé depuis peu.

Nous en avons de même déterminé la composition protidique par la même méthode:

Protides totaux	74 gr.
Sérum albumine	4 gr.80
Sérum globuline	68 gr.20

Donc teneur fortement abaissée en albumine, mais teneur voisine en globuline; celle-ci n'est d'ailleurs pas de la même qualité puisque enrichie en anticorps.

Nous n'avons essayé que quelques sels avec ces sérums, aux actions bien nettes; ces essais n'étant pas le but de notre travail.

CHLORURE DE SODIUM. -

Ces deux sérums donnent le même schéma de précipitation avec la concentration en sel, mais ils nécessitent pour flocculer des doses beaucoup plus importantes d'alcool: le début de flocculation apparaît :

- a) pour le sérum antig.g. avec 0,6 d'alcool
- b) pour le sérum anti-tét, avec 0,8 d'alcool.

SULFATE D'AMMONIAQUE

La précipitation a le même aspect qu'avec le sérum humain mais fortement retardée:

Sérum antigangréneux

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0														+++	
0.1														+++	
0.2														+++	
0.3														+++	
0.4															
0.5													+	+++	
0.6	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+++	+
0.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+

Sérum antitétanique purifié

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0														+++	
0.1														+++	
0.2														++	
0.3														+++	
0.4														+++	
0.5														+++	
0.6											+	+	+	+++	
0.7	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+++	
0.8	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+++	+++	

Donc précipitation très faible, sauf dans le tube 14 (solution saturée) où la précipitation est plus intense puisqu'il n'y a pas atténuation du précipité avec le sérum antigangréneux, et à peine avec le sérum antitétanique.

CITRATE DE SODIUM Mêmes résultats:

Sérum anti g.g.

° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		14	15
Alcool 0											+		+++	
0.1											-		+++	
0.2													++	
0.3													+	
0.4													-	
0.5													+	
0.6	+	+	+										+	

Sérum antitét.

° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		14	15
Alcool 0													+++	
0.1													++	
0.2													+	
0.3													-	
0.4														
0.5														
0.6														
0.7													+	
0.8	+	+	+										+	

Le précipité formé dans la solution saturée avant addition d'alcool, disparaît avec celui-ci et ne réapparaît que difficilement avec le sérum purifié.

FERROCYANURE DE POTASSIUM

Résultats semblables à ceux du Citrate de sodium.

Le sérum antigg. précipite moins intensément que le sérum humain aux fortes concentrations, le sérum antitét. purifié encore moins.

CYANURE DE MERCURE

Nous avons vu que ce sel n'avait aucune action, si ce n'est en solution saturée où la floculation est légèrement plus intense. Nous retrouvons exactement les résultats précédents.

SULFATE DE CUIVRE

Le sérum antigangréneux nous donne :

N° des Tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 ...	14	15
Alcool 0							+++	+++	+++	+++	+++			
0.1							+++	+++	+++	+++	+++	+++		
0.2							+++	+++	+++	+++	+++	+++		+
0.3							+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.4						+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.5					+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.6	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Le sérum antitétanique purifié

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 ...	14	15
Alcool 0						+++	+++	+++	+++	+++	+++			
0.1				++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
0.2				+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		+
0.3				+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0.4				+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0.5				+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.6			+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

Nous voyons 1°) que le sérum antigangréneux précipite, aux doses moyennes et fortes, un peu moins que le sérum humain. 2°) que la floculation est très retardée aux doses faibles; 3°) que le sérum antitétanique purifié précipite moins aux fortes doses que le sérum non purifié; mais qu'il précipite nettement plus aux doses moyennes (tubes 5 et 6) et même davantage que le sérum humain, avec une cassure nette entre 4 et 5 (seuil de floculation)

NITRATE D'URANYLE

Le sérum antigangréneux nous donne :

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0							+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.1								+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.2							+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.3							+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.4							+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.5							+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.6	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Le sérum antitétanique:

° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alcool 0						+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Alcool 0.1							+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.2						+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.3					+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.4					+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.5					+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
0.6					+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

Si, aux fortes concentrations salines il n'y a aucune différence entre les sérums, nous voyons dans les doses moyennes (7 = 5 g. par litre) une précipitation plus importante pour le sérum anti-gangréneux et davantage encore pour le sérum antitétanique purifié, par rapport au sérum humain. Aux faibles concentrations nous avons toujours ce même retard à la précipitation.

De ces quelques essais sur le sérum de cheval, il nous apparaît que la précipitation n'est pas due aux mêmes facteurs suivant la concentration.

En solution saline concentrée les sérums précipitent d'autant moins qu'ils sont plus riches en globulines et plus pauvres en albumines.

En solution saline de concentration moyenne ($\frac{M}{100}$) la floculation est d'autant plus importante que le sérum est plus riche en globulines surtout en anticorps antitoxiques et plus pauvre en albumines.

En solution diluée, et en eau distillée, la floculation est d'autant moins intense que le sérum est pauvre en albumines.

Par conséquent l'effet dispersant, protecteur de l'albumine vu par de nombreux auteurs n'est valable dans la précipitation par l'alcool, qu'en solution saline de concentration moyenne, environ $\frac{M}{100}$ en présence de cations polyvalents. Dans

tous les autres cas les sérums pauvres en albumines et riches en globulines sont beaucoup plus stables.

Si nous rapprochons ces résultats, des réactions que nous avons relatées dans la première partie et des explications qu'en ont donné les auteurs, nous nous trouvons en discordance sur quelques points.

De nombreux auteurs ont extrapolé dangereusement les résultats de leurs expériences et nous voyons là encore la nécessité absolue de bien définir les conditions de celles-ci. La concentration, la nature du sel sont des facteurs essentiels.

Pour nous, en l'absence de sels, et dans les conditions de nos expériences, les sérums riches en globulines anticorps et pauvres en albumines sont très stables alors que pour Chorine Müller, Hough, Bierry (loc.citée) toute augmentation des globulines, surtout des globulines anticorps, exalte l'aptitude à flocculer et que pour Bordet, Bourdin toute diminution de l'albumine doit entraîner une flocculabilité plus grande.

Seul Fisher (loc.cit.) avait constaté le même phénomène que nous et donnait le rôle protecteur aux globulines. Par contre pour certaines concentrations salines, et pour certains sels, nous avons bien retrouvé cette instabilité des globulines, stabilisée par l'albumine.

D

ETUDE DE LA FLOCCULATION DES SERUMS, en présence de solutions salines par le FORMOL.

Nous employons le soluté officinal de Formaldéhyde titrant 40% de formol, neutralisé, dans les mêmes conditions que l'alcool.

Par cette technique nous n'obtenons aucun changement dans l'état des tubes quel que soit le sel employé - seuls les tubes 13 et 14 (solution très concentrée et saturée) peuvent coaguler; si nous laissons les tubes 24 h. à la température ordinaire, nous obtenons une opacification ou tout au moins une gélification dans tous les tubes.

Mais que l'on s'arrête à une addition de 0 cm³ I de formol et que l'on attende un certain temps (1/2 heure à 24 h.) on constate que certains tubes s'opacifient pour certains sels. C'est donc cette dernière méthode plus sensible qui a été employée pour l'étude de l'action du formol.

I - ANIONS MONOVALENTS1°) cations monovalentsa) Chlorure de sodium

Pas de précipité dans aucun tube, ni après 24 h. ou 48 h. même avec 0,5 de formol.

b) Chlorure d'ammonium

Avec 0 cm³ I de formol, on obtient en 24 h.

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Formol 0.1 - 24 h.								++	+				++	+++	

Les différences avec les sérums étant moins nettes qu'avec le sulfate, nous n'avons pas poursuivi l'étude de ce sel.

2°) Cation divalentChlorure de magnésium

Avec 0 cm³ I de formol, on obtient en 24 heures:

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Formol 0,1 - 24 h.										+	+				

Mais sans variations sensibles avec l'origine du sérum.

II - ANIONS DIVALENTS

I°) Cations monovalents

a) Sulfate de sodium

Mêmes résultats que le chlorure.

b) Sulfate d'ammoniaque

Un sérum normal, donne en 24 heures avec 0 cm³ I de formol

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Formol 0,1 - 24 h.							+	+++	+		+	+	+++	+++	

Sur 160 sérums ainsi examinés, les sérums d'individus normaux ont donné cet aspect quelquefois même moins intense.

Les sérums de malades atteints de certaines néphrites, d'urémie, donnent un élargissement de la zone de floculation telle que :

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Formol 0,1 - 24 h.							+	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+++

Quelques malades atteints de néphrites d'origine toxique (Mercure, sulfamides) néphrites subaiguës ont pu être suivis chaque jour jusqu'à guérison - la zone de floculation s'est peu à peu rétrécie, l'intensité diminuant régulièrement, jusqu'à redevenir normale à la guérison. Cette floculation suivait exactement le taux de l'urée sanguine.

	Celle-ci était	1er dosage	dernier dosage
Jean Bel.	néphrite mercurielle	5 gr.50	0 g.30
Paul G.	néphrite adiazine	2 gr.70	0 g.25
Albert M.	néphrite subaiguë (après septicémie à staphylocoques)	2 gr.	0 g.50

A des sérums normaux nous avons ajouté de l'urée en quantité strictement équivalente aux taux ainsi signalés : nous avons exactement reproduit ces phénomènes. L'addition d'urée apportait-elle une perturbation dans le rapport sérine globuline ?

Nous avons fait des dosages sur sérum normal et sérum enrichi en urée :

	Normal (urée 0,30) + 4 g. par litre d'urée	
Protides totaux	83 gr.30	82 gr.50
sérum-albumine	55 60	55 80
" globuline	27 gr.70	26 gr.70
rapport $\frac{S}{G} = 2$		

Un autre sérum donnait une précipitation normale un peu intense par le formol; avec 4 gr. d'urée en plus: floculation massive.

Les dosages ont donné - (0 gr.45 urée) + 4 gr. d'urée

Protides totaux	85 gr.25	84 gr.
sérum albumine	25,66	23,55
sérum globuline	59,59	60,45
rapport $\frac{S}{G}$	0,46	0,35

Donc 2 sérums l'un normal $\frac{S}{G} = 2$ l'autre avec un rapport

$\frac{S}{G}$ inversé (0,46 donnent la même floculation au formol; chargés en urée, ils donnent la même précipitation massive.

Nous avons donc pensé à une action propre à l'urée dans cette action. Nous avons vu que Cabanis et Foulquier (21) ayant constaté que la réaction de Botelho est positive pour les sérums contenant plus de 0 gr.50 d'urée par litre ont accusé des "substances plus ou moins toxiques accompagnant l'urée dans les néphrites". Dans notre cas l'urée seule suffit à expliquer ces phénomènes.

Nous avons refait nos expériences à l'alcool, en présence d'urée: nous n'avons pas vu de modification - si ce n'est un léger retard dans la précipitation. Spiro, Clautriau (cité par Vlès (126) avaient signalé que l'addition d'urée (3 à 5 pour 1000) empêchait la coagulation par la chaleur. Hopkins signala en 1930 que "l'addition de solution saturée d'urée à du sérum amène la formation d'un précipité ou d'un gel, la présence simultanée d'Electrolytes en solution ne semble pas exercer une influence importante sur la dénaturation par l'urée."

Désirant vérifier l'action de l'urée dans les réactions, nous avons effectué de nombreuses réactions de Gaté et Papacostas avec et sans urée:

L'addition d'urée aux sérums normaux n'accélère pas leur gélification. Au contraire l'urée, ajoutée à des sérums formol-gélifiants en 24 h. retarde, et même supprime totalement, cette gélification si la quantité d'urée est assez forte. Si à ces sérums chargés en urée et ayant reçu du formol et qui ont perdu leur pouvoir gélifiant, on ajoute une trace de solution assez concentrée de sulfate d'ammoniaque, il y a prise en masse immédiatement avec opacification totale.

Les réactions de Takata-Ara, Weltman ne semblent pas être influencées par l'addition d'urée (20 essais sur chaque sans modifications).

Avec une forte dose d'urée (bien supérieure aux états pathologiques du sérum) on peut rendre positive des réactions de Meinicke négatives (au-dessus de 10 gr. par litre)

Nous pouvons donc dire que l'action si particulière que nous avons constatée, de l'urée, sur l'équilibre des protéines sériques, en présence de formol et de sulfate d'ammoniaque, est bien due à la présence simultanée de ces 3 facteurs. La dose de sel à partir de laquelle cette action se fait sentir (tube 8) représente l'addition au sérum, à parties égales, d'une solution de sulfate ammoniaque à 4 gr.51 par litre.

Les sérums provenant de malades atteints d'ictères et doués d'une Bilirubinémie assez élevée, nous ont donné une précipitation rapide et d'une intensité rappelant celle des sérums de néphritiques:

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Formol 0,1 - 24 h.						+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	

Là encore, ayant pu suivre les malades nous avons constaté que la floculation diminuait avec l'évolution heureuse de la maladie.

Or, si l'on ajoute de l'extrait de bile purifié Codex à un sérum normal on obtient :

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Formol 0,1 - 24 h.							++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

Nous ne reproduisons pas exactement le même phénomène mais nous pouvons admettre cependant une action du même ordre.

Ponthus (99) a montré, par des mesures physiques, que lorsque la teneur en sels biliaires croît, le volume des micelles en suspension diminue, ainsi que la tension superficielle, il n'est pas étonnant dans ces conditions que nous obtenions une précipitation intense.

Cet accroissement de précipitabilité sous l'influence des sels biliaires se retrouve dans les réactions de Gâté Papacostas: l'addition d'extrait de bile purifié rend formolgelifiants des sérums qui ne l'étaient pas.

Le mode d'action est donc tout différent de celui de l'urée

2°) CATIONS DIVALENTS

SULFATE DE MAGNESIUM

Résultat du même ordre que ceux du chlorure de Mg.

III.- ANION TRIVALENT

CATION MONOVALENT

Phosphate mono-ammonique

Nous obtenons des résultats du même ordre que ceux donnés par le sulfate d'ammoniaque :

° des tubes I 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Formol 0,1 - 24 h. + + +++ +

Le maximum est en 9 - Il n'y a pas de précipitation en 13 et 14.

Les variations sont du même ordre que celles du sulfate.

CONCLUSION

De nombreux auteurs avaient étudié l'action du formol sur les sérums à la suite de la publication par Gaté et Papacostas de la réaction de formol-gélification. Bessemans en particulier avait remarqué le rôle de la conservation, du chauffage, de l'addition de sels ou de solutions salines au sérum, sur l'accélération de la formol-gélification. Par notre technique, différente de celle de Gaté-Papacostas puisque nous diluons le sérum au 1/2, nous n'obtenons la formol-gélification que pour certains sels: sels d'ammonium, et pour une certaine concentration $\frac{M}{100} \times 3,4$ (soit 7 gr.77°/oo). Cette gélification

apparaît dans ce tube pour la plupart des sérums, même syphilitiques, d'une façon plus ou moins intense. L'étalement de la zone de floculation vers les plus fortes concentrations salines est directement en rapport avec la quantité d'urée contenue dans le sérum. Ce phénomène se retrouve donc dans toutes les azotémies d'origines diverses (néphrites etc...).

L'addition de sels biliaires au sérum produit également cet étalement de la zone de floculation, que nous retrouvons dans les sérums d'ictériques, d'une façon plus ou moins intense suivant le degré de la maladie.

Le mécanisme de ces 2 floculations doit cependant être d'origine différente puisque l'urée empêche toute formol-gélification dans la réaction de Gaté-Papacostas alors que les sels biliaires la favorisent.

Il semble bien que les sels biliaires exercent sur le sérum une action physico-chimique (tension superficielle, hydratation des micelles...) qui favorise la floculation, alors que l'urée, qui joue dans la réaction de Gaté-Papacostas avec le formol seul, le rôle de solubilisant des protides exerce une action chimique directe sur le formol en présence des sels ammoniacaux, ce qui entraîne une floculation massive des protides sériques.

QUELQUES ESSAIS SUR LA FLOCCULATION DES SERUMS

en présence de solutions salines, par l'acide Trichloracétique dilué.

Etant donnée l'action brutale de ce réactif vis-à-vis des protéines sériques, nous avons dû l'employer en solution diluée pour obtenir une action progressive.

Après de nombreux essais nous avons retenu la solution à 2%, employée suivant notre technique déjà utilisée pour l'alcool.

Nous n'avons essayé que quelques sels qui nous avaient paru intéressants pour les autres réactifs:

SULFATE D'AMMONIAQUE

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ac. trichlor.															+++
à 2%	0.1	+	+	+	+	+	+	+						+	+++
	0.2	+	+	+	+	+	+	+						+	+++
	0.3	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+	+++
	0.4	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++
	0.5	+++	+++	++++	++	++	++	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

Aux doses moyennes et surtout pour la solution à 11g.28 par litre (tube 9), le sulfate d'ammoniaque protège les protéines sériques contre la précipitation par l'acide trichloracétique; en solution concentrée il la favorise. Les faibles dose sont sans action.

CHLORURE MERCURIQUE

N° des tubes	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
Ac. Trichlor 2%					+	+	+++	+++	+++	+++			+++
	0.1				+	+	+++	+++	+++	+++			+++
	0.2	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++			+++
	0.3	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++			+++
	0.4	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++			+++
	0.5	+++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			+++

Donc précipitation du même type qu'avec l'alcool, pour les mêmes tubes - elle est seulement un peu plus précoce.

CHLORURE DE MAGNESIUM

Ce sel nous a donné le même tableau de précipitation qu'avec l'alcool. On peut cependant noter un début de précipitation plus rapide.

Des différences du même ordre ont été constatées suivant l'origine du sérum, l'état pathologique du donneur.

Par conséquent le rôle des électrolytes, des anions à forte concentration, et plus généralement des cations, est primordial dans la floculation, puisqu'à 2 réactifs précipitants très différents comme l'alcool ou l'acide trichloracétique, correspondent des aspects de floculation semblables pour un même sel.

Comparaison entre la précipitation des protéines par les électrolytes et l'"activité" de ceux-ci

Etant donnés les insuccès des lois qui régissaient les solutions et en particulier les solutions d'électrolytes, les physicochimistes ont introduit une valeur thermodynamique nouvelle : "l'activité".

Les lois idéales des solutions reposent sur les lois des gaz parfaits (Van-t-Hoff).

Si l'on considère une vapeur suivant les lois des gaz parfaits, l'énergie libre correspondant au passage d'une pression p' à une pression p est donnée par :

$$A = RT \log \frac{p}{p'}$$

De même la variation d'énergie libre A d'une solution d'électrolyte passant de la concentration C_0 à la concentration C_1 est donnée par $A = RT \log \frac{C_1}{C_0}$

Lewis en 1900 remplace les concentrations par les "activités" $A = RT \log \frac{a_1}{a_0}$

a_1 et a_0 étant les activités dans les deux états considérés. L'activité est donc une expression corrigée de la concentration. Lewis utilise comme "état de référence" la solution dans laquelle l'activité du constituant est égale à 1. Dans ces conditions le passage de cet état, dont l'activité a_0 égale 1, à l'état C_1 dont l'activité est a_1 s'accompagne d'une variation d'énergie libre $A = RT \log a_1$.

En désignant par G_1 le coefficient d'activité défini par :

$$G_1 = \frac{a_1}{C_1} \text{ on peut écrire } A = RT \log C_1 + RT \log G_1$$

Il est donc possible, par une mesure de variation d'énergie libre (électrométrie généralement) d'obtenir l'activité d'un constituant par rapport à un état de référence choisi.

On appelle coefficient stéchiométrique d'activité:

$$= \frac{a}{C} \text{ dans lequel } C = \text{concentration par kilogramme de sol-} \\ \text{solvant. Ce coefficient varie avec la température.}$$

Ce coefficient varie avec la température.

De nombreux auteurs ont établi des courbes d'activité d'un certain nombre de sels à température déterminée, généralement 25°. Pour cela ils ont mesuré en fonction de la concentration m = concentration moléculaire pour 1.000 gr. de solvant

Nous avons comparé ces courbes d'activité avec l'intensité des précipitations obtenues avec ces mêmes sels, recherchant si l'existence de maxima ou minima observés, qui ne s'expliquent pas par la variation de pH, peut trouver une explication dans les variations d'activité des sels.

Tableaux donnant à 25° en fonction de m. d'après Landolt, Börnstein (137). En dessous N° des tubes correspondants à nos essais (sensiblement).

1°) Chlorure de sodium

[illegible]

Donc pour $m=1$ il y a un minimum pour . Or dans notre précipitation, nous n'avons en 12 ni maximum, ni minimum dans l'action, qui est régulièrement proportionnelle à la concentration saline.

2°) Chlorure d'ammonium

[illegible]

Dans ce cas le minimum est donné pour $m=2$ (tube 13) alors que la précipitation décroît régulièrement jusqu'à la solution saturée.

3°) Chlorure de magnésium

m	: 0,1	: 0,2	: 0,5	: 1	: 2	: 3
25°	: 0,565	: 0,528	: 0,521	: 0,616	: 1.054	: 2,10
N° des tubes	: 9	: 10	: 11	: 12	: 13	: 14

Anion divalent

Sulfate d'ammonium

Les valeurs de 25° en fonction de m décroissent régulièrement, elles ne présentent aucun point singulier, tout au moins jusqu'au tube 12 (solution moléculaire); nous n'avons en effet pas trouvé de valeurs au delà.

Sulfate de magnésium

Il en est de même pour ce sel.

Sulfate de cuivre

Le cas de ce sel est particulièrement intéressant au point de vue de la précipitation des protéines sériques:

m	:	0,005	:	0,01	:	0,02	:	0,05	:	0,1	:	0,2	:	0,5	:	1	:	1,38
25°	:	0,573	:	0,440	:	0,343	:	0,230	:	0,164	:	0,108	:	0,068	:	0,046	:	0,0402
	:	5	:	6	:	7	:	8	:	9	:	10	:	11	:	12	:	14

Nous trouvons des valeurs de 25° rapidement décroissantes quand m croît. La précipitation des protides sériques, par contre présente un maximum (précipitation immédiatement totale) dans les tubes 7 à 11.

CONCLUSION

La comparaison entre la précipitation des protéines du sérum par l'alcool en présence de certains électrolytes, et les tables donnant "l'activité" de ceux-ci en fonction de la concentration, ne nous a pas permis de trouver une relation entre ces deux phénomènes. Ceux-ci évoluant indépendamment l'un de l'autre

Le coefficient d'activité présente un minimum pour certaines concentrations avec certains électrolytes qui donnent dans la précipitation des protides une progression continue. Le phénomène inverse se présente également.

CONCLUSION GENERALE

Après avoir défini une technique précise pour l'étude de la floculation des sérums en présence de certains réactifs, nous avons examiné par cette méthode un millier de sérums tant normaux que pathologiques.

Les recherches bibliographiques, les expériences et les résultats que nous avons exposés, nous ont permis d'apporter notre contribution dans la recherche du rôle de certains facteurs dans les réactions de floculation.

1°) Rôle de l'état pathologique du sujet:

L'un des buts principaux de notre travail était de rechercher l'existence éventuelle d'une relation entre le degré et la qualité de la floculation des sérums et l'état pathologique des sujets.

Bien qu'ayant été limités en fait, dans la variété et le nombre des cas pathologiques étudiés, nous pouvons cependant indiquer, qu'avec plusieurs sels, en présence d'alcool, les sérums syphilitiques donnent une précipitation différente de celle obtenue avec les sérums normaux;

avec le chlorure de magnésium les sérums de syphilitiques précipitent, pour une même dose d'alcool, pour une concentration saline supérieure à celle nécessaire pour les autres sérums.

Ce qui est l'inverse de ce que Sicher et Wiedmann ont trouvé dans la réaction de Weltmann: la coagulation par la chaleur est obtenue en présence de quantité de chlorure de Ca inférieures à celles nécessaires pour les sérums normaux.

Avec le sulfate d'ammoniaque, ils présentent un maximum de précipitation, lorsque la solution saline ajoutée contient 1 à 2% de sel, alors que pour cette dose les autres sérums donnent un minimum.

Par la méthode au formol, nous avons pu mettre en évidence que les sérums d'azotémiques et d'ictériques précipitent d'autant plus fortement et d'autant plus rapidement que la teneur en urée ou en sels biliaires et pigments biliaires est plus élevée.

2°) RÔLE DE L'ALCOOL. -

L'intensité de la floculation pour une même dose d'alcool varie avec les différents sérums.

Les sérums dont les protéines sont fortement imbibées nécessitent plus d'alcool pour un même degré de précipitation,

donc précipitent moins pour une même dose d'alcool. C'est le cas des sérums de malades atteints d'oedèmes (cardiaques, néphrétiques). Par contre chez les hypertendus, ou dans les maladies causant une augmentation des protéines totales (sans changement notable du rapport albumines globulines) nous obtenons une précipitation beaucoup plus intense.

Il en est de même pour les sérums d'ictériques.

3°) ROLE DU FORMOL. -

L'action du formol sur les sérums ne nous a pas permis une différenciation importante.

Nous avons vu que le sérum nous donne une gélification dans certains cas; dilué au 1/2 avec nos solutions salines, il ne se produit normalement, non seulement une gélification, mais une opacification totale, que pour les sels d'ammonium à la dose de 2 à 5 pour 1.000; cette opacification pouvant s'étendre vers les concentrations supérieures.

4°) ROLE DES DIFFERENTS SELS ETUDIES. -

Nous avons utilisé toute une gamme de sels, combinant des anions et des cations, mono et polyvalents, pour rechercher le rôle qui revient à chacun d'entre eux.

a) ANIONS. - Il ressort de nos essais que la valence de l'anion a un rôle assez faible.

L'action du chlorure de sodium est la même que celle du sulfate, du citrate et même du ferrocyanure, compte tenu de la solubilité du sel employé.

Il faut cependant signaler que dans les fortes concentrations solution saturée, solution moléculaire, alors que les sels de sodium ou d'ammonium à anion monovalent empêchent la précipitation par l'alcool, ceux à anion bivalent la favorisent (sulfates). Cette action est encore plus nette avec les sels à anion trivalent (citrate de sodium, phosphates d'ammoniaque) ou tétravalent (ferro-cyanure de potassium)

Cette propriété des anions polyvalents donne pour les sels à cation monovalent, une précipitation avec minimum aux concentrations moyennes: $\frac{M}{10}$

b) CATIONS. - C'est à eux que semble revenir le rôle principal dans les expériences que nous avons relatées.

MONOVALENTS. - Les sels à cation monovalent ont la propriété de s'opposer à la précipitation par l'alcool: action d'autant plus intense que les solutions sont plus concentrées, à l'exception, pour les solutions très concentrées, des sels à anions polyvalents.

DIVALENTS. - Les cations divalents doivent être divisés en métaux alcalinoterreux et en métaux lourds. Pour les premiers (calcium et aussi magnésium) nous obtenons le même effet dissolvant aux fortes concentrations (sauf anions polyvalents) que celui donné par les cations monovalents; mais pour les concentrations moyennes ($\frac{M}{10}$) il se produit une augmentation très nette de la précipitabilité par l'alcool. Nous avons vu que la concentration en sel donnant ce maximum peut varier dans certains cas pathologiques.

Pour les métaux lourds, il se produit un phénomène plus complexe. En effet, ceux-ci ont une action directe propre sur les protéines sériques même en absence d'alcool.

Le sulfate de cuivre, et mieux encore le chlorure, présentant un aspect "renforcé" de la précipitation donnée par les sels de magnésium (étalement de la zone centrale de précipitation, même sans alcool) font la transition avec le chlorure mercurique.

Celui-ci précipite directement, sans alcool, les protéines sériques depuis la concentration $\frac{M}{100}$ jusqu'à, y compris, la solution saturée.

Le cas du cyanure de mercure est intéressant; bien que de formule identique au chlorure, il ne produit absolument aucun effet sur la précipitation par l'alcool. Ne libérant pas d'ions en solution, il n'est pas électrolyte;

Pour les sels à cation divalent et anion polyvalent (phosphate monocalcique) les deux effets se combinent et donnent une précipitation avec 2 maxima.

TRIVALENTS. - Nous retrouvons le type de précipitation des cations divalents. Le sulfate d'aluminium en particulier, rappelle l'action du sulfate de cuivre.

Le nitrate d'Uranyle, quoique sel d'un métal hexavalent fonctionne comme sel d'un radical divalent et donne la même précipitation que celle du chlorure mercurique.

5°) ROLE DU pH. -

Etant donné les théories, que nous avons rappelées dans l'introduction, relatives à la floculation au point isoionique, il était nécessaire de savoir à quel pH se produisait la précipitation lors de nos essais.

Les différences constatées suivant les sels, n'étaient-elles dues qu'à des différences dans le pH des solutions ?

Nos recherches systématiques du pH des solutions utilisées, de celui du mélange final avec le sérum, et après addition d'alcool, nous ont montré que:

Des sels à précipitation très différente: chlorure d'ammonium, chlorure de magnésium, donnent, mélangés au sérum des solutions présentant la même gamme de pH.

Des sels à précipitation semblable présentent en solution des pH très différents: le chlorure de magnésium précipitant les protéines du sérum à pH 8,25 et le phosphate monoammonique qui donne cette même précipitation pour une même concentration saline, à pH 6,50.

Le phosphate monocalcique présente 2 maxima, l'un à pH 5,95 dû au cation (correspondant en concentration au maximum du chlorure de calcium qui se trouve à pH 8,25) l'autre à pH 2,4 dû à l'anion (correspondant en concentration au maximum du sulfate d'ammoniaque; pH 7, du phosphate diammonique pH 8, et du citrate de sodium pH 9)

Il présente de plus un minimum vers pH 4 qui, pour le sulfate de cuivre, le chlorure mercurique, le nitrate d'uranyle ou le sulfate d'aluminium, se trouve dans la zone de précipitation maxima.

Il semble donc qu'une théorie purement physique d'une zone de précipitation au point isoélectrique des protéines, ne suffise pas à expliquer ces phénomènes. Il faut retenir également une action directe, chimique, du cation et dans certains cas de l'anion, sur les protéines et pour certaines concentrations salines.

De plus, le pH propre du sérum, son pouvoir tampon, ne sont pas des facteurs importants dans notre méthode.

6°) pH des SELS "NEUTRES". -

Nous avons parlé au début, suivant en cela la plupart des auteurs, de précipitation par les "sels neutres".

On entend alors par sel neutre, un sel dans lequel les valences de l'acide sont saturées par un nombre égal de valences de la base. C'est une neutralité de titration.

Cependant l'étude du pH de nos solutions nous a montré que

a) Seuls les sels tels que le chlorure ou le sulfate de sodium ou de potassium sont "neutres" en solution.

c) La plupart des autres sels ne sont pas neutres:

les solutions moléculaires de chlorure ou de sulfate d'ammonium sont acides (pH 5,2-5,4)

Celles de chlorure de magnésium sont alcalines (pH 7,6) comme celles de citrate de sodium (pH 9) de phosphate triammonique (pH 9,65) ou même diammonique, dit monoacide (-pH 8)

Le phosphate diacide d'ammonium est moins acide en solution Moléculaire (pH 4,0) que le sulfate de cuivre (pH 3,6) ou le chlorure mercurique ou d'aluminium.

Etant donnée l'importance prise par la notion de pH, il nous a semblé préférable de ne pas appeler phosphate acide, un sel alcalin ou sulfate neutre un sel acide. La saturation des valences n'entraîne pas la neutralité qui dépend des ions en présence.

7°) ROLE DES DIFFERENTES PROTEINES dans la stabilité ou la labilité des sérums.

Il est admis par la plupart des auteurs que l'albumine possède un rôle stabilisant vis-à-vis de la globuline; nous avons vu de plus que dans les maladies qui présentent une diminution du rapport albumine, le sérum acquiert une aptitude globuline plus grande à la floculation.

Les essais que nous avons effectués sur des sérums riches en globulines et pauvres en albumines (sérum de cheval antigangréneux et sérum antitétanique purifié) ont montré que :

Ces sérums et surtout le sérum privé d'albumine (antitétanique) nécessitent de très fortes doses d'alcool pour précipiter même en présence de sels alcalins ou alcalinoterreux.

En présence de métaux lourds le phénomène devient plus complexe : aux très faibles doses (solutions M et au-dessous) 1000 précipitabilité très faible. Aux doses faibles (solution M) 100

le sérum antig.g. précipite moins que le sérum humain alors que le sérum antitétanique purifié précipite davantage; aux très fortes concentrations, le sulfate de cuivre précipite le sérum antig.g. comme le sérum humain, mais le sérum purifié précipite moins fortement.

Par conséquent, l'action propre à l'anion semble directement proportionnelle à la teneur en albumine. Il en est de même de la précipitabilité par l'alcool aux très faibles concentrations salines.

Aux concentrations voisines de $\frac{M}{100}$ l'effet protecteur de l'albumine contre la précipitation par l'alcool semble par contre prédominant. A teneur voisine en globulines le sérum pauvre en albumines précipite davantage.

Dans la formolgelification les sérums riches en globulines et pauvres en albumines se gélifient d'autant plus rapidement qu'ils sont plus pauvres en albumines. Ceci permet d'expliquer les différences constatées par certains auteurs, ce rôle protecteur attribué aux albumines ou aux globulines dépendant des conditions d'expérience en particulier de la nature du sel employé, de sa concentration et du réactif précipitant.

8°) ROLE DE L'UREE. -

Nous avons vu que l'addition d'urée au sérum ne joue pas un rôle important dans la précipitation par l'alcool, si ce n'est une légère diminution dans l'intensité de celle-ci.

Il n'en est pas de même dans l'action du formol:

En absence de sels, l'urée s'oppose à la gélification par le formol, à des taux assez faibles pour être rencontrés (2 à 4 gr. o/oo) ce que l'on peut expliquer par l'effet solubilisant des solutions d'urée sur les protides, mais aussi par un blocage du formol par l'urée. Ce phénomène est donc une cause d'erreur importante dans la réaction de formolgelification.

En présence d'électrolytes autres que les sels d'ammonium, son action est la même. Mais en présence de l'ion NH_4^+ il se produit le phénomène inverse:

L'urée augmente ou déclanche une gélification avec opacification totale pour les solutions salines $\frac{M}{100}$

Si le taux d'urée est augmenté, cette action se produit également pour les concentrations salines supérieures.

Il est exact qu'en solution concentrée l'urée et le formol donnent en présence de sulfate d'ammoniaque une combinaison

insoluble formant gel opaque. Mais celui-ci ne se forme pas avec les solutions diluées que nous employons et les "constituants du sérum" ont un rôle dans cette action. La recherche du mécanisme de ce phénomène sort du cadre de ce travail.

9°) ROLE DES SELS BILIAIRES. -

Nous avons vu que les sérums d'ictériques précipitaient plus facilement par l'alcool que les sérums normaux même en absence de sels (tube N°I); cette même labilité se retrouve dans la précipitation par le formol en présence de sulfate d'ammoniaque. Nous avons pu reproduire certains de ces phénomènes (précipitation par le formol) en ajoutant des sels biliaires (extrait de bile purifié Codex) à du sérum normal. De même nous avons rendu formol gélifiants des sérums par addition de ces sels biliaires. L'activité de ceux-ci sur la tension superficielle, la grosseur et l'hydratation des micelles protéiques pourrait expliquer ces phénomènes. Cependant ces sels biliaires sont incapables de modifier la réaction de Takata et influent peu la précipitation par l'alcool ou le chlorure mercurique. Il faut donc penser là encore à un phénomène différent suivant les réactifs utilisés. La précipitation par le formol semblant toujours beaucoup plus sensible aux variations des corps qui comme l'urée, les sels biliaires, modifient l'hydratation des protides.

Vu, Paris le 17/11/47

Le Doyen de la Faculté

Signé : R. FABRE

Vu et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Le Vice-Président du Conseil de

l'Université de Paris

J. CABANNES

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Ch. ACHARD - Les protéines dans l'organisme
Biol. Méd. 1936 t. 26 p. 161
- 2 - Ch. ACHARD - GRIGAUT et CODOUNIS
Bull. soc. Chim. Biol. 1930 p. 417
- 3 - AMBARD et SCHMIDT - variations des points isoélectriques des albumines en rapport avec les symptômes morbides et généraux.
Bull. Soc. Méd.Hôp. Paris 1928 N° 21 p. 604
- 4 - SYDNEY AUERBACH.- Die Weltmannische Hitze koagulation in Punktaten.
Klin Woch - Oct. 1936 t. 15 p. 1449
- 5 - HANS BAB - Sur la nécessité de la présence de Spirochètes dans le foie de foetus destiné à la préparation de l'anti-gène.
DEUTSCHE-Médiz. Woch - Dec 1906 - p. 1935
- 6 - P. et M. BALINT - Zum méchanismus der Takata réaktion-Biochem Zeitschr. t. 313 N° 3 4 Oct. 1942 p.201
- 7 - J.G. BASNUEVO et SUTTER.- La réaction de Kopaczewski
Bull. ass. franç. études cancer t.24 1935 p.224
- 8 - BENADELLI - Nouvelle réaction du sang
Biochem. Zeitsch 1922 t.134 p.181
- 9 - IVAN BERTRAND, J. GUILLAUME, Melle D. QUIVY.- Intérêt de la réaction de Weltmann dans les tumeurs cérébrales.
Soc. Biol. 23 Mars 1946.
- 10 - BESSEMANS A. Concordance relative et defectueuse de la réaction de Gaté-Papacostas avec la réaction de B.W.
C.R. Soc. Biol. t.87 1922 p.101
- 11 - -1d- Influence de la concentration des sérums sur le formol gélification
C.R. Soc. Biol. t.87 1922 p. 398
- 12 - -1d- Influence de la dilution sur le pouvoir formol-gélifiant des sérums
C.R. Biol. t.87 1922 p.401
- 13 - BESSEMANS et L. VAN BOECHHEL: Modification expérimentale du pouvoir formolgélifiant des sérums
C.R. Soc. Biol. t.86 1922 p.958

- 14 - BIERRY Bull.acad.Méd.20 Juillet 1943
- 15 - J. BORDET Traité de l'immunité - Paris-Masson 1939
- 16 - P. BORDET Annales de l'Inst. Pasteur 1936
- 16 bis - J. BOUCEK Lactogélification des sérums d'animaux immunisés
Trav. de l'Inst. Hyg. Publ. Tcheco 1935 - p.39
- 17 - M. BOURDIN Préparation industrielle des sérums thérapeutiques
Centre de documentation chimique N° 631 p.6
- 18 - Andrée BOUTARIC Contribution à l'étude physicochimique de quelques
colloïdes hydrophiles
Thèse de Pharm. Sup. Nancy 1936.
- 19 - BRUCK Münch-Méd. Woch 1917
- 20 - BRUCK Münch.Méd.Woch 1917 p.1126
- 21 - CABANIS et FOULQUIER : La réaction de Botelho
C.R. Soc. Biol. t.88 1923 p.1011
- 22 - J. CAMINOPETROS : Séroflocculation spécifique de la Leishmaniose
interne
C.R. Soc. Biol. t.115 1934 p.910
- 23 - L. CAPPON La Lactogélification sérique comme indice de néo-
formation
C.R. Soc. Biol. t. 120 1935 p.235
- 24 - P. CARTANA La Leishmaniose canine
C.R. Soc. Biol. t. 120 1935 p.63
- 25 - CERUTI La frazioni proteiche del siero nelle malattie
Giorn. Ital. di dermat. et Sifil. 1932 p.858
- 26 - CHOPRA et N.N.De - The significance of Antimony test in the
diagnostic of Kala-Azar
Indian-Méd.gaz-t.64 N° 12 1929 p.661
- 27 - CHORINE Les réactions de flocculation dues aux euglobulines.
Thèse Méd. Paris 1936
- 28 - CHORINE L'instabilité du sérum dans l'eau dist. Annal.
Inst. Pasteur t.60 1938 p. 633
- 29 - CHORINE et KOECHLIN : Diagnostic du paludisme par mesure de
l'instabilité du sérum dans l'eau distillée
Bull. Soc. Path. Exot. t.28 p.375
- 30 - CHORINE et PRUDHOMME - Flocculation des sérums par l'eau distillée
C.R. Soc. Chim. Biol. t. 115 1934 p.290

- 31 - COHN, LUETSCHER, ONGLEY, ARMSTRONG et DAVIS
J. Am. Chem. Soc. 1940 t. 52 p.3396
- 32 - COSTA, cité par SUCHET
Annal. Biol. Clin. Janvier 1944 p.42
- 33 - DARANYI J.V. Réaction de Colloïdolabilité du sérum
Deutsch. Médiz.Woch. 28 Avril 1922 p.553
- 34 - DEMANCHE
Précis de technique du sérodiagnostic de la syphilis
3^e édition Doin-Paris 1944
- 35 - DETRE L.
Recherche des substances antisyphilitiques et de
leurs antigènes chez les syphilitiques
Wein.Klin.Woch t.19 1906 p.619
- 36 - DI BENEDETTO et STORNELLO : Sulla reazione de Kopaczewski nei
tumori maligni
Acta cancrologica t.2 1936 p.495
- 37 - MAURICE DOLADILHE - Sur quelques propriétés physiques du sérum
sanguin.
C.R. Acad. Sciences t.198 1934 p.1184 et 1189
- 38 - DOURIS R.
Guide pratique pour l'examen et l'analyse du sang
2^e édition - Vigot Frères 1939
- 39 - W.K. DUNSKUMBE The serum formalin reaction in some cases of
leprosy
Trans. R. Soc. of trop. Méd. a Hyg. t.20 1927 p.512
- 40 - FABIANI et DENDALE - valeur de la lactogélification du sérum
comme test de guérison du Kala-Azar
Bull. Soc. Path. exot. t.28 1935 p.560
- 41 - R. FISHER
Equilibre colloïdal du sérum sanguin
C.R. Soc. Biol. t.87 1922 p.124
- 42 - P. FLEURY
Fiches techniques de chimie biologique et supplément
Véga - Paris 1946
- 43 - FORNET et SCHERESCHESKY : Le Sérodiagnostic du Tabès, de la
P.G. et de la syphilis, par les précipités spécifi-
ques.
Münch Méd. Woch 1907 N°30
- 44 - E. FREUND et B. LUSTIG : Die Verteilung der di Wassermann
Meinicke-Trübungs U.S.W. dedingenden substanzen
Bio. Zeitschr. t.249 1932 p.373
- 45 - GARTNER
Sur la réaction de Brück
Berl. Klin - Woch Juin 1917 p.603

- 46 - GATE et PAPACOSTAS : Nouvelle réaction des sérums syphilitiques
C.R. Soc. Biol. t. 83 1920 p. 1432
- 47 - GATE et PAPACOSTAS : La formol-gélification dans diverses maladies
C.R. Soc. Biol. t. 87 1922
- 48 - id. La formol-gélification dans la fièvre typhoïde
C.R. Soc. Biol. t. 89 1923 p. 1305
- 49 - A. GERMAN Les Pyrogènes
Ann. Pharm. Franç. 1947 (sous presse)
- 50 - G. GERNEZ, H. WAREMBURG, A. BRETON et A. PONTTHIEU
Variation du taux des protéides sériques au cours
de l'abcédation aseptique
Bull. I.P. 1945
- 51 - R. GILLIER Lactogélification des sérums
C.R. Soc. Biol. t. 118 1935 p. 1324
- 52 - P. GIRAUD et CIAUDO : Bull. Path. exot. t. 28 1935 p. 379
- 53 - JERZY GLASS Untersuchungen zum mechanismus
der Takata-reaktion
Klin-Woch t. 15 1936 p. 1489
- 54 - GRABAR Les globulines du sérum
Liège - Paris 1947
- 55 - W. GROS Bedeutung der Flockungs reaktion mit Hayenschen
Lösung im Klinischen Verlaufsbild des Parenchymik-
terus Klin Woch N°40 Oct. 1942 p. 877
- 56 - A. GUY A propos de la réaction de Kopaczewski
Bull. Ass. franç. études Cancer t. 24 1935 p. 224
- 57 - R. HANLRICH Résultats d'une réaction sérologique dans le cas
de tumeur maligne
Klin Wochenschr
- 58 - HENRY Contribution à l'étude sérologique de l'infection
palustre.
Gaz. Hebd. Sc. Méd. Bordeaux t. 48 1927 p. 317
- 59 - F. HOGENAUER et T. GROBL : Utilisation clinique de la réaction
de Bendien pour le diagnostic du cancer
Wiener Klin, Wocht. 62 1935 p. 1320
- 60 - H. HONDA et S. YANAGI : Colloid lability of blood serum
Jap. J. Ostetr. t. II 1928 154 et 191
- 61 - HOPKINS Denaturation of proteins by urée and relates substan-
ces Nature 126 1930 p. 388

- 62 - HOWE P.E. J. Biol. Chem. 49 1921 p.115
- 63 - HUGONOT et SOHIER Valeur de la réaction de Takata-Ara
C.R. Soc. Biol. t. 104 1934 p.708
- 64 - KABAT E.A. J. Immunol t.46 1943 p.513
- 64 bis - KUIGSBURG, CLARK, WILLIAM et POST
Journ. Lab. clin. Méd. 11-981- 1927
- 65 - KLAUSNER Wiener Klin, Woch. 1908 p.214
- 66 - id. Sur la nature de la réaction de Klausner
Bioch. Zeitsch t. 43 1912
- 67 - W. KOPACZEWSKI La réaction de lactogélification sérique
Bull. Sc.Pharm. t.42 1935 p.135
- 68 - id. La lactogélification sérique considérée comme
indice de néoformation
C.R. Ac. Sciences t.199 Déc. 1934 p. 324
- 69 - JOHANNESKRETZ et OLGA KUDLEC : Recherches sur les protéines du
sérum par la réaction de Weltmann
Zeitsch f. Klin Méd. t.127 1934 p.590
- 70 - KRUYT : cité par Boutaric : les colloïdes et l'état colloïdal
Paris 1931
- 71 - H. KUHNE La réaction de Weltmann au cours de la tuberculose
pulmonaire.
Zeitschr. Tuberk. t. 89 1942 p.42-48
- 72 - L. LANGERON et H. D'HOUR : sur la positivité de la réaction de
floculation à la résorcine
C.R. Soc. Biol. t.98 1928 p.982
- 73 - LANDSTEINER MILLER et POTZL : A propos de la réaction de fixation
du complément
Wiener Klin. Woch 1907 N°50
- 74 - LE BOURDELLES et LIEGEOIS : Contribution à l'étude de la réaction
de Henry
C.R. Soc. Biol. t. 98 1928 p.1342
- 75 - B. BOURDELLES et R. MAUVAIS : Mesure de la floculation en eau
distillée
C.R. Soc. Biol. t.127 1938 p.767
- 76 - LE GAC La réaction de Botelho dans la lèpre technique
d'Itchikawa et de Baum.
Bull. Soc. Path. exot. t.23 1930 p.105

- 77 - LESUVAT et VITAS : Action sur certains sérums d'un mélange sublimé sulfate de sodium.
Arch. Inst. Past. Afrique du Nord t.2 1922 p.451
- 78 - LEVADITI et MARIE : Action du liquide céphalo rachidien des paralytiques généraux sur le virus syphilitique
C.R. Soc. Biol. t.12 1907 p.872
- 79 - LEVADITI et YAMAMOUCHI : Sérodiagnostic de la syphilis
C.R. Soc. Biol. t.12 1907 p.740
- 80 - LOEB Les protéines et la théorie des phénomènes colloïdaux.
Traduction Mouton Paris - Alcan 1925
- 81 - G. LOEHLIN Modification des protéines du sérum de cheval sous l'influence de l'immunisation.
Zeitscher - Immunitätsf t. 102 1942 p.189
- 82 - MAC DONACH Le gel réaction
Médical - Press 1916
- 82 bis - MACLAGAN - Brit Journ. Exp. Path. 25 - 234 - 1944
- 83 - CH. MARQUARDT Recherches sur la réaction du sérum chauffé à 100° d'après Kurten.
Klin. Wochenschr. Mars 1943 p.232
- 83 bis - MATEER, BALTZ, STEELE, BROUWER, COLVERT
G. Am. Méd. Ass. 133 - 909 - 1927
- 84 - P. MEYER-HECK Résultats obtenus avec la réaction polarographique dans le sérum.
Zeitschr. Krebsforsch t. 52 1941 p.144
- 85 - MICHAELIS Réaction de la syphilis de Wassermann
Berlin Klin. Woch 1907 n°35
- 86 - P.S. MILLS Indian Journ. of Méd. Rés. t. 9 1922 p.830
- 87 - CH. MONDAIN DOURIS ET BECQ : au sujet du sérodiagnostic du cancer
Ann. Inst. Past. t. 41 1927 p.1097
- 88 - R. MULLER et W.H. HOUGH : Wien Klin. Woch t.24 1911 p.167
- 89 - MULLER Technique simplifiée par Teufl de la réaction de Weltmann
Zeltsch Klin. Méd. 1942 140 p.74
- 90 - A.E. NAPIER A new serum test for kala-azar Indian Jour. of méd. Res. t. 9 1922 p.830

- 91 - L. NATTAN-LARRIER et DL.GRIMAUT RICHARD: Sérodiagnostic des affections Leishmaniennes par la formol-stibosane réaction -
C.R. Soc. Biol. t.116 1934 p.492 etc...
- 92 - NICOLAU DE BETTENCOURT : Formol gélification des sérums syphilitiques
C.R. Soc. Biol. t.86 1922 p.620
- 93 - OTTOJUL-NIELSEN : On sérodiagnostic of cancer
Acta Méd. scand. suppl. 78 1936 p.339
- 94 - PAOLINO W. Reazione seriche di precipitazione da chlorure di mercurio - Patteri fisico-chimici
Arc. scio. Méd. 72 1941 p.1-40
- 95 - PAPACOSTAS et GATE: Remarque concernant l'action du formol sur les solutions colloïdales
C.R. Soc. Biol. t.85 1921 p.869-1029
- 96 - C.I. PARHON et KAHANE: sur la séro floculation au point de vue illikibiologique
C.R. Soc. Biol. t.113 p.395
- 97 - PAUZAT Sur la formol gélification des sérums syphilitiques
C.R. Soc. Biol. t.84 1920 p.503
- 98 - A. POHLMANN Une nouvelle réaction de la syphilis; séro-chimique de Brück
Deutsch. Médiz-Woch 22 Mars 1917
- 99 - PONTIUS Modifications micellaires du sérum humain par les électrolytes faibles
C.R. Soc. Biol. t.103 p.1140
- 100 - R. PRUD'HOMME Rôle du CO² dans certaines propriétés du sérum sanguin.
Ann. Inst. Past. t.57 1936 p.545
- 101 - A. PRUNELL La réaction à la résorcine dans la fièvre typhoïde
C.R. Soc. Biol. t.99 1928 - 1450
- 102 - St J. PRZYLECKI Action simultanée de l'alcool et des électrolytes sur la gélatine au point isoélectrique
C.R. Sol. Biol. 1930 t.104 p.1077
- 103 - STEPHAN RECHT-UEBER die Théorie des Takata réaktion
Klin. Woch t. 15 1936 p.1006
- 104 - RENAUX et PETROVANU : Intervention du phénomène de labilité du sérum dans les réactions du sérum frais (Hecht)
C.R. Soc. Biol. t.93 1925 p.854

- 105 - HELFRIED ROSEGGER : Experimentelle Beeinflussbarkeit des Weltmanschen Koagulation bandes
Zeitsch Klin, méd. t.135 1939 p.441
- 106 - B.N.C. ROY Formolgelification in syphilis
Calcutta Médico Journ. t.18 1924 p.559
- 107 - RUBINSTEIN et MAZOT: Le serodiagnostic de la syphilis selon Bruc!
C.R. Soc. Biol. t.80 1917 p.540
- 108 - SARRAILHE (a) Diagnostic biologique du Kala-Azar
Revue coloniale N° 70 1935 p.134
- 109 - A.A. SCHMIDT et KLARA TULTSCHINSKAJA: Recherches sur l'immunité
Zeitsch. f. Immunitätsf. T. 79 1933 p.311
- 110 - H.W. SCHMIDT: Détermination polarographique des sérum-globuline:
Bioch.Zeitschr. t.306 p.422
- 111 - SCHWENKENBECHER : Modification des colloïdes du sérum chez les tuberculeux
Beit. Z.Klin. Tuberk. t. 98 1942 p.220
- 112 - SICHER GRETE ET WIEDMANN ALBERT: La zone de coagulation de Weltmann dans la syphilis
Méd. Klin t.30 1934 p.1664
- 113 - SIMON Précipitation du sérum par l'alcool, l'acétone
Archivio di Fisiologica t.4 1907 p.594
et tome 5 1908 p.394-402-470
- 114 - SPACKMANN Sérum aldehydstest applied to trypanosomiasis
British Journ. Méd. N° 3287 1923 p.1257
- 115 - STRASZYNSKI ADAM - Labilité colloïdale des protéines du sang dans les réactions sérologiques
Bull. Inst. Past. 1925 p.200
- 116 - E. STRAUSS et J. KAUTNIZT: sérum albumin as a protective colloïd for euglobuline in the formol gel réaction
Arch. Biochem t.4 1944 p.159-162
- 117 - TEUFL Technique de la réaction de Weltmann
Wien Arch. Imm Méd. 28 1936 p.305
- 118 - TRENSZ Différences qualitatives entre les euglobulines du sérum normal et paludéen
C.R. Soc. Biol. t.118 1935 p.1076
- 119 - TRENSZ De l'influence des ions salins sur la floculation
C.R. Soc. Biol. t.119 1935 p.266

- 120 - TRENSZ Arch. Inst. Past. Algérie t. 13 1935 p.513
- 121 - H. UCKO Untersuchungen zum méchanismus der Takata réaktion
Klin. Woch. t.15 1936 p.1074
- 122 - VAN DER SCHEER, WYCKOFF et CLARKS
J. immunol t.41 1941 p.349
- 123 - A. VERNES Travaux et publications de l'Institut prophylacti-
que fascicule 4
- 124 - A. VERNES, BRICQ et GAGER: Conditions expérimentales du diagnos-
tic sérologique des cancers.
Arch. Inst. Prophyl. Tome I N° I p.43
- 125 - A. VERNES et GAGER: Syphilis et tuberculose
C.R. Soc. Biol. t.93 1925 p.1625
- 126 - VLES Précis de chimie physique
Vigot 1929
- 127 - VLES et DE COULON : Recherches sur les propriétés physio-chimi-
ques des tissus en relation avec l'état normal ou
pathologique de l'organisme.
Arch. phys. Biol. 1924 p.43
id. 1926 p.125
id. 1927
- 128 - VOIGTLANDER Recherches sur la réaction de coagulation d'après
Weltmann
Klin. Woch t.13 1934 p.1718
- 129 - A. WASSERMANN De l'état actuel du sérodiagnostic de la syphilis
Berlin Klin Woch Déc. 1907 p.1599
- 130 - WASSERMANN, NEISSER et C. BRUCK: Eine sérodiagnostische
réaktion bei syphilis
Deutsch, médiz: Woch 10 Mai 1906 p.745
- 131 - WASSERMANN NEISSER, BRÜCK et A. SCHUCHT
Zeitsch f. Hyg. t.55 1906 p.451
- 132 - WASSERMANN et PLAUT: De la présence anticorps-syphilitiques dans
le liquide cérébrospinal
Deutsch Médiz. Woch. Nov. 1906 p.1769
- 133 - WEGIEVKO Recherches sur la floculation
C.R. Soc. Biol. t.91 1924 p.717
- 134 - E. WIEDMANN: Schw Méd. Woch t. 76 1946 p.241

- 135 - WILBOUCHEVITCH: La réaction de Botelho
C.R. Soc. Biol. t.87 1922 p.1339
- 135 bis - VINCENT et R. LAGREU
Premier Congrès intern. de Biol. Clinique
à paraître dans Ann. Biol. Clin. 1948
- 136 - E. WOLLMANN : Les nouvelles méthodes de sérodiagnostic de
la syphilis.
Bull. Inst. Past. 1920 p.217
- 137 - LANDOLT, BORNSTEIN, ROTH, SCHEEL
Physikalisch-Chemische-Tabellen
Berlin 1931 et 1935

